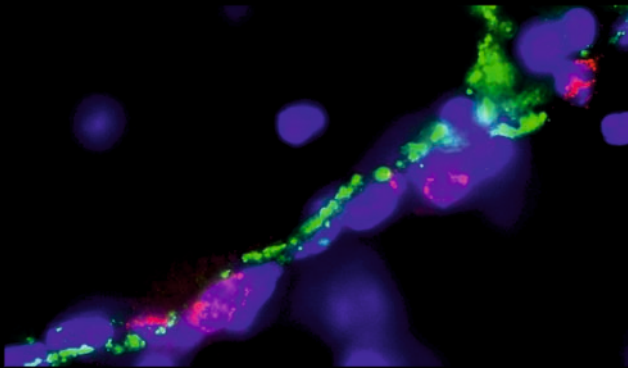


Untersuchungen zur Rolle von NF-IL6 und Immunzellen für Kommunikationswege zum Gehirn bei systemischen Entzündungsreaktionen

Jenny Schneiders



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2015

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1st Edition 2015

© 2015 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für
Veterinär-Physiologie und –Biochemie der
Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: PD Dr. Christoph Rummel

Untersuchungen zur Rolle von NF-IL6 und Immunzellen für Kommunikationswege zum Gehirn bei systemischen Entzündungsreaktionen

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

Jenny Schneiders

Tierärztin aus Ahlen (Westfalen)

Gießen 2015

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Kramer

Gutachter: PD Dr. Christoph Rummel
Prof. Dr. Hermann Willems

Tag der Disputation: 26.06.2015

„So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig, man muss sie für fertig erklären, wenn man nach der Zeit und den Umständen das Möglichste getan hat.“

(Johann Wolfgang von Goethe)

I. Einleitung	- 7 -
1. Die „sickness response“	- 7 -
2. Kommunikationswege zwischen Immunsystem und ZNS	- 8 -
2.1 Der humorale Signalweg	- 9 -
2.2 Der zelluläre Signalweg	- 24 -
2.3 Der nervale Signalweg	- 27 -
3. Der Transkriptionsfaktor NF-IL6	- 28 -
3.1 Struktur	- 28 -
3.2 Bedeutung	- 29 -
3.3 Signaltransduktion	- 31 -
3.4 Regulation	- 33 -
4. Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse	- 35 -
4.1 Anatomischer Aufbau	- 35 -
4.2 Aktivierung	- 36 -
4.3 Funktion	- 37 -
4.4 Regulation	- 37 -
5. Serotonin-System	- 38 -
5.1 Tryptophan-Metabolismus unter physiologischen Bedingungen	- 38 -
5.2 Tryptophan-Metabolismus bei Inflammation	- 40 -
5.3 Interaktion mit der HPA-Achse	- 41 -
5.4 Depressive Störungen	- 42 -
6. Versuchsmodelle	- 43 -
6.1 LPS-induzierte Entzündungsreaktion	- 43 -
6.2 Induktion der Neutropenie	- 43 -
7. Zielsetzung der Arbeit	- 43 -

II. Material und Methoden	- 46 -
1. Allgemeine Materialien	- 46 -
1.1 Technische Geräte.....	- 46 -
1.2 Software	- 46 -
1.3 Chemikalien	- 47 -
1.4 Ge- und Verbrauchsmaterialien	- 47 -
2. In vivo Versuche.....	- 48 -
2.1 Materialien	- 48 -
2.2 Versuchstiere.....	- 51 -
2.3 Versuchsaufbau und Ablauf.....	- 65 -
2.4 Operation.....	- 68 -
2.5 „Novel environment stress“	- 69 -
2.6 Injektionen	- 69 -
2.7 Perfusion und Probenentnahme	- 70 -
2.8 Erfassung physiologischer Daten.....	- 72 -
3. <i>In vivo</i> Versuche am Douglas Mental Health University Institute, McGill University, Montréal, Canada.....	- 77 -
3.1 Materialien	- 77 -
3.2 Versuchstiere.....	- 77 -
3.3 Versuchsablauf.....	- 77 -
4. Immunfluoreszenz und Immunhistochemie	- 78 -
4.1 Materialien	- 78 -
4.2 Grundlagen der Methode	- 81 -
4.3 Herstellung von Gehirnschnitten am Kryostat.....	- 83 -
4.4 Versuchsprotokoll	- 85 -

4.5	Mikroskopie	- 88 -
4.6	Auswertung und Statistik	- 89 -
5.	Quantitative Real-Time PCR	- 90 -
5.1	Materialien	- 90 -
5.2	Grundlagen der Methode	- 92 -
5.3	RNA-Extraktion	- 94 -
5.4	Reverse Transkription	- 97 -
5.5	Durchführung der quantitativen Real-Time PCR	- 98 -
5.6	Ermittlung der optimalen endogenen Kontrolle mit Hilfe des Primer Design „Reference Gene Kits“	- 98 -
5.7	Auswertung und Statistik	- 99 -
6.	Zytokin-Bioassays	- 100 -
6.1	Materialien	- 100 -
6.2	Grundlagen der Methode	- 101 -
6.3	IL-6.....	- 102 -
6.4	TNF α	- 104 -
6.5	Auswertung und Statistik	- 104 -
7.	ELISA	- 105 -
7.1	Materialien	- 105 -
7.2	Grundlagen der Methode	- 105 -
7.3	IL-10.....	- 106 -
7.4	Corticosteron.....	- 107 -
7.5	Auswertung und Statistik	- 108 -
8.	Western Blot	- 108 -
8.1	Materialien	- 108 -

8.2	Grundlagen der Methode	110 -
8.3	Proteinextraktion.....	111 -
8.4	Durchführung des Western Blots.....	112 -
8.5	Immunfärbung.....	114 -
8.6	Gel-Gegenfärbung.....	115 -
8.7	Auswertung und Statistik.....	116 -
9.	Färbung von Ausstrichen.....	117 -
9.1	Materialien	117 -
9.2	Grundlagen der Methode	117 -
9.3	Versuchsprotokoll	117 -
9.4	Auswertung	118 -
III.	Ergebnisse	119 -
1.	Physiologische Parameter von NF-IL6-Knockout-Mäusen sowie Wildtyp-Mäusen unter basalen Bedingungen, bei „novel environment stress“ und bei LPS-induzierter systemischer Entzündung.....	119 -
1.1	Körperkerntemperatur.....	119 -
1.2	Aktivität	122 -
1.3	Futter- und Wasseraufnahme	124 -
1.4	Körpergewicht.....	125 -
1.5	Ausstriche des Blutes und des Kapselinhalts.....	125 -
2.	Charakterisierung der Bedeutung von NF-IL6 für den humoralen Kommunikationsweg zum Gehirn.....	126 -
2.1	Mediatoren in der Peripherie	127 -
2.2	Mediatoren im ZNS	133 -
2.3	Transkriptionsfaktoren.....	137 -
2.4	Zielgene.....	145 -

3. Beeinflussung des zellulären Kommunikationswegs zum Gehirn durch NF-IL6.....	151 -
3.1 Neutrophile Granulozyten.....	153 -
3.2 Beeinflussung der Kommunikation zwischen Peripherie und ZNS durch Neutropenie	166 -
3.3 Perivaskuläre Makrophagen.....	177 -
4. Beeinflussung der Entzündungsreaktion durch das LIP:LAP-Verhältnis	178 -
5. Veränderungen der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse in NF-IL6-Knockout-Mäusen.....	180 -
6. Veränderungen des Serotonin-Systems in NF-IL6-Knockout-Mäusen	188 -
IV. Diskussion	193 -
1. Rolle von NF-IL6 für Fieber und die „sickness response“	193 -
1.1 Beeinflussung des humoralen Kommunikationswegs durch NF-IL6....	195 -
1.2 Beeinflussung des zellulären Kommunikationswegs durch NF-IL6	198 -
1.3 Beeinflussung anderer Transkriptionsfaktoren durch NF-IL6	202 -
1.4 Mögliche Beeinflussung der NF-IL6-Aktivität	204 -
1.5 Signifikanz dieser Ergebnisse	206 -
2. Einflüsse von NF-IL6 auf die Stress-Antwort.....	208 -
2.1 Beeinflussung der Stress-Achse durch NF-IL6	208 -
3. Einfluss von NF-IL6 auf die basale lokomotorische Aktivität.....	212 -
3.1 Beeinflussung des Tryptophan-Metabolismus durch NF-IL6	213 -
4. Fazit und Ausblick.....	217 -
4.1 NF-IL6 ist an der Aufrechterhaltung und an der Beendigung der Fieberantwort und der Entzündungsreaktion beteiligt.....	220 -
4.2 NF-IL6 beeinflusst die Rekrutierung von Immunzellen zum Gehirn....	221 -
4.3 Die basale Aktivität der HPA-Achse wird durch NF-IL6 beeinflusst ...	222 -

4.4	NF-IL6 beeinflusst die innere Uhr	- 222 -
4.5	NF-IL6 ist an der Entstehung LPS-induzierter Depressionen beteiligt.-	222 -
V.	Zusammenfassung	- 224 -
VI.	Summary	- 228 -
VII.	Abkürzungen	- 231 -
VIII.	Anhang	- 266 -
1.	Publikationen	- 266 -
1.1	Originalarbeiten in Fachzeitschriften.....	- 266 -
1.2	Veröffentlichte Abstracts	- 266 -
1.3	Sonstige Konferenzbeiträge	- 266 -
2.	Danksagung	- 268 -
3.	Erklärung	- 270 -

I. Einleitung

1. Die „sickness response“

Eine Entzündung kann durch verschiedene Noxen ausgelöst werden, wie zum Beispiel durch Infektionen oder Traumata. Eine Aktivierung des Immunsystems erfolgt dabei über zwei verschiedene Stoffgruppen: Die „pathogen-associated molecular patterns“ (PAMPs) sind Moleküle, die auf Pathogenen zu finden sind, z. B. das Lipopolysaccharid (LPS), das in den Zellwänden gram-negativer Bakterien vorkommt, und somit infektionsbedingte Entzündungsreaktionen initiieren (Janeway und Medzhitov 2002). Die „danger-associated molecular patterns“ (DAMPs) hingegen sind Moleküle, die normalerweise im Zytoplasma oder im Kern von körpereigenen Zellen vorkommen und bei Gewebsschädigungen freigesetzt werden (Rubartelli und Lotze 2007), z. B. das „high-mobility group box 1“ (HMGB1). Diese Stoffe induzieren also nicht-infektiöse Entzündungsreaktionen. Das angeborene Immunsystem reagiert auf solche Noxen mit einer Aktivierung verschiedener Immunzellen und der Bildung weiterer, endogener inflammatorischer Mediatoren. Diese Reaktion dient der Eliminierung der auslösenden Noxe und der Reparatur des geschädigten Gewebes. Sie kann lokal begrenzt oder systemisch ablaufen (Luheshi 1998; Dantzer et al. 2008).

Eine systemische Entzündungsreaktion geht dabei mit typischen, zentral-nervös kontrollierten Krankheitssymptomen einher, der sogenannten „sickness response“. Dieser Symptomkomplex ist eine ausgeklügelte Reaktion des Organismus zur Bekämpfung von Infektionen (Hart 1988). Das bekannteste dieser Symptome ist das Fieber. Dabei kommt es in den thermoregulatorischen Kontrollzentren der präoptischen Region des Hypothalamus zu einer Verschiebung der Schwellenwerte, bei denen thermoregulatorische Mechanismen gestartet werden (Vybiral et al. 1987; Boulant 2000; Romanovsky 2007). Somit kommt es zu einer aktiven Hochregulation der Körperkerntemperatur. Dies ermöglicht eine schnellere Immunreaktion, da die erhöhte Temperatur zu einer erhöhten Mobilität und erhöhten Phagozytoseleistung der Leukozyten sowie zu einer schnelleren Proliferation der T-Lymphozyten führt (Nahas et al. 1971; van Oss et al. 1980; Narvanen et al. 1986; Lee et al. 2012). Zusätzlich

hemmt diese Temperaturerhöhung auch die Aktivität bestimmter, sehr temperaturempfindlicher Bakterien (Fischler und Reinhart 1997). Verschiedene Studien haben bereits gezeigt, dass Fieber sehr wichtig für die Bekämpfung von Infektionen ist und eine antipyretische Behandlung den Krankheitsverlauf oft negativ beeinflussen kann (Weinstein et al. 1997; Schulman et al. 2005; Lee et al. 2012). Ein weiteres typisches Krankheitssymptom ist Appetitlosigkeit. Dadurch wird unter anderem die Verfügbarkeit von Eisen vermindert, was viele Bakterien, insbesondere bei erhöhter Temperatur, zur Reproduktion benötigen (Kluger und Rothenburg 1979). Gleichzeitige Apathie bzw. Lethargie reduziert den Energieverlust. Zusammen mit einer Umstellung des Protein- und Lipidstoffwechsels kann somit trotz verminderter Nahrungsaufnahme genug Energie zur Aufrechterhaltung des Fiebers bereitgestellt werden, was jedoch mit Gewichtsverlust einhergeht. Die verminderte Aktivität bewirkt außerdem eine verminderte Fressfeind-Exposition kranker und geschwächter Tiere. Hyperalgesie schließlich veranlasst zur Schonung verletzter oder entzündeter Körperteile, wodurch die Heilung begünstigt wird (Hart 1988).

2. Kommunikationswege zwischen Immunsystem und ZNS

Für die Kommunikation zwischen peripherem Immunsystem und zentralem Nervensystem (ZNS), die während systemischer Entzündungsreaktionen zur Auslösung der „sickness response“ führt, werden bisher drei verschiedene Wege beschrieben: Der humorale Kommunikationsweg ist bereits am längsten bekannt (Beeson 1948; Atkins 1960). Er besagt, dass exogene fieberauslösende Substanzen (Pyrogene, z. B. LPS) zum Teil indirekt die Entstehung von Fieber durch Freisetzung endogener Pyrogene (z. B. Interleukin (IL)-6) über das Blut bewirken. Eine schnellere Kommunikation zwischen Immunsystem und ZNS hingegen erfolgt über den nervalen Kommunikationsweg (Ross et al. 2000). Eine Stimulation afferenter Äste des Vagus-Nervs bewirkt dabei die frühe Induktion der „sickness response“. Der dritte und am wenigsten bekannte Kommunikationsweg ist der zelluläre Pfad (Shaftel et al. 2007; Aguilar-Valles et al. 2014). Immunzellen werden dazu stimuliert, in das Gehirn einzuwandern und induzieren dort eine lokale Freisetzung inflammatorischer Mediatoren.

2.1 Der humorale Signalweg

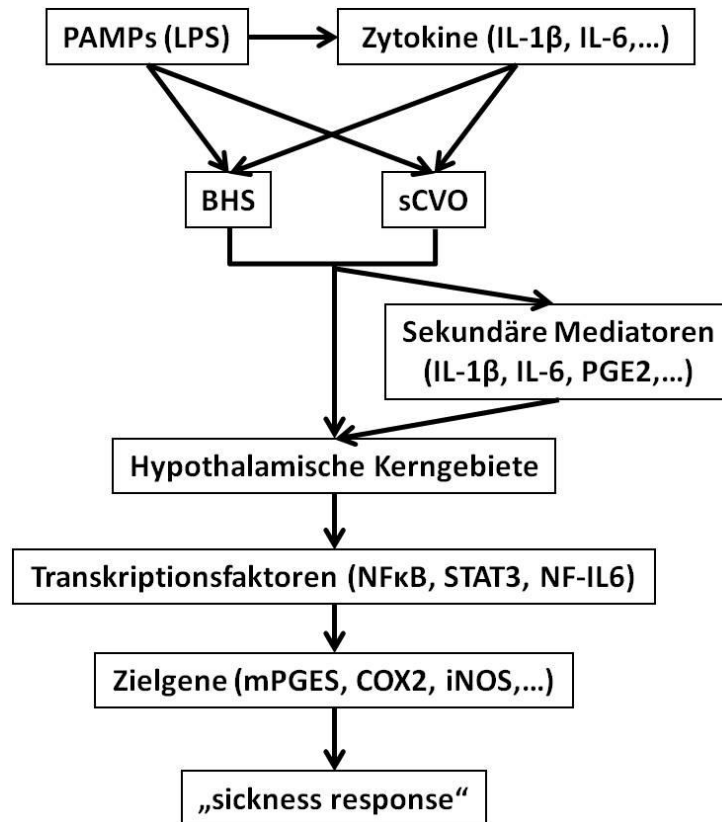


Abbildung I-1

Überblick über den humoralen Kommunikationsweg zwischen Immunsystem und Gehirn. „Pathogen associated molecular patterns“ (PAMPs) wie z. B. Lipopolysaccharid (LPS) bewirken die periphere Freisetzung von Zytokinen wie z. B. Interleukin (IL)-1 β oder IL-6. Diese können dann Zellen der Blut-Hirn-Schranke (BHS) oder der sensorischen circumventrikulären Organe (sCVO) aktivieren, welche dann wiederum direkt oder indirekt über sekundäre Mediatoren hypothalamische Kerngebiete aktivieren. Dadurch werden Transkriptionsfaktoren aktiviert, die die Expression von Zielgenen regulieren und somit die „sickness response“ auslösen. Wichtige Zielgene sind unter anderem die mikrosomale Prostaglandin E Synthase (mPGES) und die Cyclooxygenase 2 (COX2) als geschwindigkeitsbestimmende Enzyme des Prostaglandin E₂ (PGE₂)-Synthesewegs, sowie die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS).

2.1.1 Mediatoren in der Peripherie

Bei der Übermittlung inflammatorischer Signale von der Peripherie ins ZNS spielt das angeborene Immunsystem eine wichtige Rolle. Verschiedene Leukozyten, insbesondere neutrophile Granulozyten (NG), Makrophagen und Monozyten, erkennen eingedrungene PAMPs mit Hilfe von „pattern-recognition-receptors“. Bei der Erkennung von LPS z. B. ist der toll-like Rezeptor (TLR) 4 von zentraler Bedeutung

(Aderem und Ulevitch 2000; Uematsu und Akira 2006). Bindet ein PAMP an einen solchen Rezeptor, induziert dieser in den Immunzellen daraufhin die Synthese und anschließende Freisetzung verschiedener endogener Pyrogene, die zur Gruppe der Zytokine gehören (Beeson 1948; Luheshi 1998; Rummel et al. 2011; Damm et al. 2012). Als erstes Zytokin erscheint der Tumornekrosefaktor (TNF) α im Blut, gefolgt von geringen Mengen IL-1 β (Givalois et al. 1994). Beide können einander induzieren (Dinarello et al. 1986; Ikejima et al. 1990) und stimulieren außerdem die Expression eines weiteren Zytokins: IL-6 (Elner et al. 1992). IL-6 kann während der Entzündungsreaktion über einen längeren Zeitraum in großen Mengen im Blut nachgewiesen werden. Insbesondere bei viralen Infektionen werden außerdem Interferone (IFN) gebildet, z. B. IFN- α (Fensterl und Sen 2009). Im Verlauf der Entzündung werden außerdem auch anti-inflammatorische Zytokine in die Zirkulation freigesetzt, z. B. IL-1-Rezeptor-Antagonist (IL-1ra) oder IL-10 (Marsh und Wewers 1994; Foey et al. 1998).

2.1.1.1 TNF α

Das Zytokin TNF α wurde ursprünglich als zirkulierender tumorsupprimierender Faktor (Carswell et al. 1975) sowie als Mediator für Kachexie entdeckt (Beutler et al. 1985). Auch während der „sickness response“ ist er unter anderem mitverantwortlich für Appetitlosigkeit und Gewichtsverlust. Gebildet wird er dabei von Makrophagen, Mastzellen, T-Lymphozyten sowie natürlichen Killerzellen (Satomi et al. 1981; Christmas et al. 1987; Cuturi et al. 1987; Steffen et al. 1989). TNF α wirkt über zwei verschiedene Rezeptoren: TNFR I und TNFR II. Aktivierung des TNFR I kann entweder Apoptose induzieren oder über die Aktivierung von NF κ B (Micheau und Tschopp 2003) zu einer Freisetzung pro-inflammatorischer Mediatoren und anti-apoptotischer Faktoren führen (Wang et al. 1998). TNFR II hingegen vermittelt eher anti-inflammatorische Wirkungen, wobei ebenfalls NF κ B sowie verschiedene andere Transkriptionsfaktoren beteiligt sind. So kann eine selektive Aktivierung des TNFR I, z. B. durch TNFR-I-Agonisten oder durch TNF α in TNFR-II-defizienten Neuronen, Apoptose verursachen, während TNFR-II-Agonisten z. B. vor Exzitotoxizität schützen (Marchetti et al. 2004). Zusätzlich sind TNFR-I-defiziente Mäuse vor klinischen

Symptomen der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis geschützt, während TNFR-II-defiziente Mäuse verstärkte Symptome zeigen (Suvannavejh et al. 2000). Auch die Gefahr eines septischen Schocks nach hohen Dosen LPS ist in TNFR-I-defizienten Mäusen vermindert, während sie auf Infektionen mit intrazellulären Erregern wie z. B. *Listeria monocytogenes* jedoch mit erhöhter Letalität reagieren (Pfeffer et al. 1993). Systemische Gabe von TNF α kann eine normale Fieberreaktion induzieren (Dinarello et al. 1986), während Hemmung des TNF α lediglich die späte Fieberphase hemmt (Roth et al. 1998). TNF α könnte also für die Aufrechterhaltung des Fiebers verantwortlich sein. Tatsächlich wurde aber bereits auch eine Rolle von TNF α für die Induktion von Hypothermie beschrieben. Inhibition von TNF α verkürzt z. B. die durch eine septische LPS-Dosis hervorgerufene Hypothermie (Tollner et al. 2000). Peripher appliziertes TNF α kann zudem LPS-induziertes Fieber hemmen (Klir et al. 1995). Des Weiteren aktiviert TNF α die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HPA-Achse) (Bernardini et al. 1990), fördert die Migration von NG (Ming et al. 1987; Shalaby et al. 1987) sowie die Phagozytose von Makrophagen (Wirth und Kierszenbaum 1988). Hervorzuheben bleibt aber, dass entsprechend der unterschiedlichen Rezeptoren auch anti-inflammatorische Effekte des TNF α beschrieben wurden (Wirth und Kierszenbaum 1988). Insgesamt ist die Rolle dieses wichtigen Zytokins also noch nicht eindeutig geklärt und könnte abhängig vom Stimulus und der Phase der Entzündungsreaktion unterschiedlich ausfallen (Hehlhans und Pfeffer 2005).

2.1.1.2 IL-1 β

IL-1 wurde ursprünglich als Lymphozyten-aktivierender Faktor entdeckt (Gery et al. 1972). Erst 1985 wurde erkannt, dass IL-1 in zwei verschiedenen Formen vorkommt: IL-1 α und IL-1 β (March et al. 1985). Für die Entzündungsreaktion ist insbesondere IL-1 β wichtig, dass als Pro-Protein in Makrophagen, NG, Endothel- und Epithelzellen produziert wird und anschließend durch Caspase 1 (auch IL-1 „converting enzyme“) zur aktiven Form gespalten wird (Moore et al. 1980; Miossec et al. 1986; Tiku et al. 1986; Kostura et al. 1989). Es sind bisher drei IL-1-Rezeptoren bekannt, nämlich IL-1R1, IL-1R2 und IL-1R3, wobei über IL-1R2 keine Signalweiterleitung erfolgt und IL-

IL-1 nur im ZNS zu finden ist (Sims et al. 1993; Qian et al. 2012). Während einer systemischen Entzündungsreaktion sind nur geringe IL-1-Mengen im Blut zu finden (Givalois et al. 1994; Harden et al. 2011). Bei Abwesenheit bzw. Inhibition von IL-1 kann LPS Fieber induzieren, die späte Fieberphase ist jedoch deutlich vermindert (Long et al. 1990; Smith und Kluger 1992; Luheshi et al. 1996). Systemische Applikation von IL-1 jedoch induziert eine Fieberreaktion (Roth et al. 1998). IL-1 spielt also für die Fieberentstehung eine wichtige Rolle und scheint unter anderem für die Aufrechterhaltung des Fiebers verantwortlich zu sein. Eine weitere Funktion von IL-1 ist die Aktivierung der HPA-Achse, wobei es auf die „corticotropin releasing hormone“ (CRH)-Neurone im Hypothalamus (Tsagarakis et al. 1989; Hsieh et al. 2010), die Hypophyse (Bernton et al. 1987) oder direkt auf die Nebennierenrinde wirken kann (Andreis et al. 1991).

2.1.1.3 IL-6

IL-6 wird während systemischer Entzündungen von verschiedenen Zellen wie z. B. Monozyten (Navarro et al. 1989), natürlichen Killerzellen (Avanzi et al. 1989), Endothelzellen (Norioka et al. 1988) und Fibroblasten (Van Damme et al. 1989) gebildet. Sein Rezeptor ist membranständig und besteht aus zwei unterschiedlichen Untereinheiten: Jeweils zwei gp130 Molekülen sowie einer Zytokin-bindenden Untereinheit (dem eigentlichen IL-6-Rezeptor), die auch als lösliche Form vorkommen kann (Hirano et al. 1990). Die IL-6-Plasmalevel korrelieren während der systemischen Entzündung mit der Höhe des Fiebers (LeMay et al. 1990). Neutralisation des IL-6 unterdrückt LPS-induziertes Fieber (Cartmell et al. 2000; Rummel et al. 2006), aber dennoch ist peripher appliziertes IL-6 nur schwach pyrogen (Harre et al. 2002). Zusammen mit dem Fakt, dass es in höheren Konzentrationen erst nach Beginn des Fiebers im Blut nachweisbar ist (Jansky et al. 1995), deutet dies ebenfalls auf eine Rolle des IL-6 für die Aufrechterhaltung des Fiebers hin. Des Weiteren trägt auch IL-6 zur Aktivierung der HPA-Achse bei (Turnbull et al. 2003).

2.1.1.4 IL-1ra

IL-1ra ist ein Antagonist des IL-1, da er an den IL-1R1 bindet, diesen jedoch nicht aktiviert (Hannum et al. 1990; Granowitz et al. 1991). IL-1ra wird ähnlich wie IL-1

während Entzündungsreaktionen in Makrophagen (Corradi et al. 1993), NG (Re et al. 1993) sowie Endothel- und Epithelzellen gebildet (Dewberry et al. 2000). Er dient der Modulation der durch IL-1 β vermittelten Effekte und ist damit einer der endogenen antipyretischen Mechanismen (Ulich et al. 1991; Dinarello 1992). Bereits 1949 wurde entdeckt, dass Fieber bei Menschen selten 41 °C überschreitet (Du 1949). Es wurde also vermutet, dass es kompensatorische Mechanismen geben muss, die die Höhe des Fiebers begrenzen. Diese endogenen antipyretischen Mechanismen wirken wie IL-1ra den pro-inflammatorischen Zytokinen entgegen und modulieren so die Fieberantwort. Zu diesen Mechanismen gehören außerdem IL-10 sowie die HPA-Achse (siehe Kapitel I.4).

2.1.1.5 IL-10

IL-10 wird bei Entzündungen von Monozyten und Lymphozyten gebildet (O'Garra et al. 1990; de Waal Malefyt et al. 1991; Yssel et al. 1992). Es hemmt die Produktion verschiedener pro-inflammatorischer Zytokine wie z. B. TNF α , IL-6, IL-1 β und Anderen (de Waal Malefyt et al. 1991). Neutralisation oder Gen-Knockout von IL-10 bewirkt eine verlängerte Fieberantwort und bei hohen LPS-Dosen eine erhöhte Letalität (Leon et al. 1999; Harden et al. 2014). Somit zählt IL-10 ebenfalls zu den endogenen antipyretischen Mechanismen.

2.1.2 Signalweiterleitung ins ZNS

Zytokine sind relativ große (15-25 kDa), hydrophile Moleküle, die nicht durch die Blut-Hirn-Schranke (BHS) von der Peripherie ins Gehirn diffundieren können. Es gibt jedoch andere Mechanismen der Signalweiterleitung peripherer Mediatoren an das ZNS. Eine Möglichkeit ist ein sättigbarer, transendothelialer Transport durch die BHS. Dieser wurde bereits für IL-1 β , IL-6 sowie TNF α nachgewiesen. Die so erreichten Mengen an Mediatoren im ZNS liegen jedoch deutlich unterhalb der Konzentrationen, die für die Auslösung von Fieber benötigt werden. Die Relevanz dieses Mechanismus für die Entstehung der „sickness response“ ist also eher zweifelhaft (Banks 2005). Ein weiterer Mechanismus der Signalweiterleitung an das ZNS ist die Aktivierung von Endothelzellen der BHS bzw. perivaskulärer Makrophagen und Gliazellen durch Zytokine im Blutstrom, woraufhin diese Zellen weitere Botenstoffe an das ZNS

abgeben (Verma et al. 2006). Eine dritte Möglichkeit ist außerdem der Übertritt peripherer Mediatoren in die sensorischen circumventrikulären Organe (sCVO), da diese eine undichte BHS aufweisen (Roth et al. 2004).

2.1.2.1 Die Blut-Hirn-Schranke

Alle Landwirbeltiere besitzen die Blut-Hirn-Schranke an Kapillaren des ZNS sowie die Blut-Liquor-Schranke am *plexus choroideus* und der *arachnoidea* als physiologische Barriere zwischen dem Blutkreislauf und dem ZNS (Bechmann et al. 2007). Sie dient der Aufrechterhaltung des inneren Milieus im ZNS und dem Schutz vor Krankheitserregern, Toxinen und anderen schädlichen Stoffen. Blutgefäße im Gehirn werden, ähnlich wie in der Peripherie, von Endothelzellen gebildet. Während in peripheren Blutgefäßen das Endothel jedoch mit Öffnungen (Fenestrierungen) und Intrazellularspalten versehen ist, sind die Blutgefäße im Gehirn jedoch von einem kontinuierlichen, lückenlosen Endothel ohne Fenestrierungen oder Intrazellularspalten umgeben. Die Endothelzellen sind dabei durch feste Zell-Zell-Verbindungen („tight junctions“) verbunden, wodurch der parazelluläre Transport von Substanzen verhindert wird (Brightman und Reese 1969). Auf den Endothelzellen, insbesondere an den Übergängen zwischen zwei Endothelzellen, liegen die Perizyten. Sie bedecken insgesamt etwa 20 % der Oberfläche der Kapillaren. Mit den Endothelzellen sind sie über fokale Adhäsionen zur mechanischen Verankerung sowie durch „gap junctions“ zur Verbindung der Zytoplasmen und zum Austausch von Stoffen verbunden (Cuevas et al. 1984). Ihre Funktionen sind unter anderem die weitere Verdichtung der BHS (Wakui et al. 1997), Aufnahme von Fremdmaterial und Erregern durch Phagozytose (Balabanov et al. 1996), durch Kontraktion die lokale Regulation des Blutdrucks in den Kapillaren des Gehirns (Boado und Pardridge 1994; Schonfelder et al. 1998) sowie die Unterstützung der Rekrutierung von NG zum Gehirn während systemischer Entzündungsreaktionen (Pieper et al. 2013). Die Endothelzellen und die Perizyten sind außerdem von einer Basallamina umgeben. Von außen sind die Kapillaren zusätzlich noch zu 99 % mit den Endfüßchen von Astrozyten bedeckt (Dempsey und Wislocki 1955). Diese dienen der Versorgung der Endothelzellen mit Nährstoffen und können außerdem die Durchlässigkeit der BHS regulieren (siehe auch Abbildung I-2), obwohl

sie nicht zur eigentlichen Blut-Hirn-Schranke gehören. Insgesamt wird durch die beschriebenen Mechanismen erreicht, dass nur lipophile, kleine Moleküle die BHS passieren können.

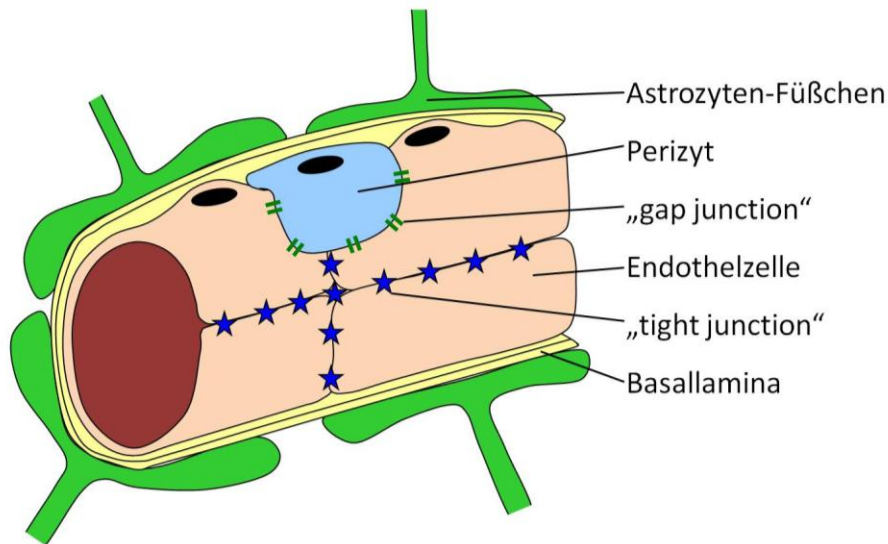


Abbildung I-2

Aufbau der Blut-Hirn-Schranke: Kapillaren im Gehirn werden von Endothelzellen gebildet, die durch „tight junctions“ fest miteinander verbunden sind. Auf den Endothelzellen befestigte Perizyten verstärken die Abdichtung des Endothels und dienen außerdem der Phagozytose.

Umgeben sind diese Zellen zusätzlich noch von einer Basallamina sowie den Füßchen der Astrozyten. Modifiziert nach (Carvey et al. 2009)

Die Endothelzellen der BHS sowie perivaskuläre Makrophagen besitzen auf ihrer luminalen Seite Rezeptoren für IL-1 (Konsman et al. 2004), $\text{TNF}\alpha$ (Bebo und Linthicum 1995) und IL-6 (Vallieres und Rivest 1999). Auch TLR4 wurden dort unter inflammatorischen Bedingungen bereits nachgewiesen (Singh und Jiang 2004; Chakravarty und Herkenham 2005). Binden inflammatorische Mediatoren oder PAMPs an diese Rezeptoren, kommt es zu einer Ausschüttung weiterer Signalmoleküle wie z. B. IL-6 oder Prostaglandin E_2 (PGE_2) (An et al. 2011). Diese Mediatoren werden an der abluminalen, also dem Gehirn zugewandten, Seite der Zellen ausgeschüttet und können dort weitere Zellen, z. B. Neurone, Astrozyten oder Mikrogliazellen aktivieren.

2.1.2.2 Circumventrikuläre Organe

Circumventrikuläre Organe (CVO) sind Strukturen im Gehirn, denen eine normale BHS fehlt. Sie liegen in unmittelbarer Nähe zu den Gehirnventrikeln und sind stark vaskularisiert. Die Endothelien dieser Blutgefäße sind fenestriert, so dass Substanzen aus den Gefäßen austreten können. Zum Ventrikellumen und auch zum umliegenden Gehirngewebe sind sie durch Tanyzyten abgegrenzt. Das sind hochprismatische Gliazellen, die basal einen langen Fortsatz tragen, der in das CVO hineinragt und apikal mit Mikrovilli besetzt und untereinander durch „tight junctions“ verbunden sind. Dadurch wird ein unkontrollierter Übertritt von Substanzen aus den CVO in angrenzendes Gehirngewebe verhindert.

Die CVO können in sekretorische und sensorische CVO eingeteilt werden. Für die Übermittlung inflammatorischer Signale ans ZNS sind die sensorischen CVO (sCVO) von besonderer Bedeutung. Zu ihnen zählen die *area postrema* (AP) in der Wand des 4. Ventrikels und das *organum subfornicale* (SFO) sowie das *organum vasculosum lamina terminalis* (OVLT) in der Wand des 3. Ventrikels. Sie zeichnen sich dadurch aus, dass sie Neurone enthalten, deren Axone eine Signalweiterleitung an andere Gehirnstrukturen ermöglichen (Siso et al. 2010). In den sCVO finden sich viele Zytokin-Rezeptoren z. B. für IL-1 β (Konsman et al. 2004), IL-6 (Vallieres und Rivest 1997) und TNF α (Nadeau und Rivest 1999) sowie TLR (Laflamme und Rivest 2001; Chakravarty und Herkenham 2005). Sowohl inflammatorische Zytokine als auch PAMPs können also in die sCVO gelangen und dort Parenchymzellen aktivieren. Daraufhin werden lokal weitere inflammatorische Mediatoren produziert (Nakamori et al. 1994; Quan et al. 1999). Sowohl die neu gebildeten als auch die zirkulierenden Zytokine können dann weitere Zellen im sCVO stimulieren und so z. B. ein Aktionspotential in den Neuronen induzieren, wodurch wiederum die Weiterleitung des Signals an andere Gehirnstrukturen ermöglicht wird (Shibata und Blatteis 1991; Ota et al. 1997).

2.1.3 Steuerungszentren der „sickness response“

Die Mediatoren, die in den sCVO und in den Endothelzellen sowie perivaskulären Zellen der BHS gebildet wurden, gelangen schließlich in die Gehirnregionen, in denen die „sickness response“ gesteuert wird.

Die präoptische Region des Hypothalamus mit dem *nucleus praeopticus medianus* (MnPO) ist hauptsächlich für die Fieberentstehung zuständig (Cooper et al. 1967). Durch Injektion von PGE₂ in den MnPO kann eine Fieberantwort ausgelöst werden (Tanaka und McAllen 2005), während selektive Deletion des PGE₂-Rezeptors EP₃ im MnPO sowohl PGE₂- als auch LPS-induziertes Fieber hemmt (Lazarus et al. 2007). Für die Aktivierung dieser Region wird aufgrund der räumlichen Nähe dem OVLT eine Hauptrolle zugesprochen, was durch Läsionsstudien bestätigt wurde (Blatteis et al. 1983; Stitt 1985).

Das MnPO ist außerdem, gemeinsam mit dem SFO, für die Regulation von Durstgefühl und Wasseraufnahme zuständig (Simpson und Routtenberg 1973; Gardiner und Stricker 1985), während die Regulation von Appetit und Futteraufnahme vom *nucleus arcuatus* (Arc) kontrolliert wird (Dawson und Annau 1983).

Der *nucleus paraventricularis* (PVN) produziert verschiedene Hormone, z. B. das „corticotropin-releasing hormone“, das die Freisetzung von adrenocorticotropem Hormon (ACTH) aus der Hypophyse induziert. Er ist also an verschiedenen hormonellen Regulationen beteiligt, unter anderem auch an der HPA-Achse (Raux-Demay und Girard 1985).

Der *nucleus suprachiasmaticus* (SCN) ist verantwortlich für die Steuerung diurnaler Rhythmen. Er erhält Afferenzen aus verschiedenen Gehirnstrukturen, z. B. dem OVLT, SFO, PVN und der AP (Nishino et al. 1976; Krout et al. 2002).

Die AP ist eine weitere wichtige Schaltstelle zwischen Immunsystem und ZNS bei der Entstehung der „sickness response“, da sie nicht nur sCVO ist, sondern auch durch die Afferenzen des *nervus vagus* (siehe auch Kapitel I.2.3) stimuliert wird. Eine Weiterleitung von Signalen erfolgt unter anderem an den PVN (Sawchenko und

Swanson 1982) und den *nucleus tractus solitarius*, der z. B. eine Rolle im Serotonin-System spielt (Yamasaki und Lico 1981).

2.1.4 Transkriptionsfaktoren

Die Bindung inflammatorischer Mediatoren an ihre Rezeptoren auf der Oberfläche ihrer Zielzellen im ZNS führt zu einer Aktivierung von Transkriptionsfaktoren. Diese gelangen daraufhin in den Zellkern und regulieren dort die Transkription verschiedener Zielgene. Im Laufe einer systemischen Entzündung ist NF („nuclear factor“) κ B der erste Transkriptionsfaktor, der im ZNS aktiviert wird (Nadjar et al. 2003), gefolgt von STAT3 („signal transducer and activator of transcription“) (Rummel et al. 2005). NF-IL6 wird erst im späteren Verlauf der Entzündung aktiviert (Damm et al. 2011).

2.1.4.1 NF κ B

NF κ B liegt in entsprechend inaktivierten Zellen als Homo- oder Heterodimer der Untereinheiten p50 und p65 im Zytoplasma vor. Komplexbildung mit dem „inhibitor of κ B“ (I κ B) verhindert eine Translokation in den Nukleus der Zelle und damit eine genomische Aktivierung (Baeuerle und Baltimore 1996). Bindet z. B. IL-1 β an den IL-1R1 oder LPS an den TLR4 wird innerhalb der Zelle über das Adapterprotein MyD88 („myeloid differentiation primary response protein“) die Serin/Threonin Kinase IRAK (IL-1-Rezeptor assoziierte Kinase) an den Rezeptor gebunden (Muzio et al. 1997). Es kommt zu einer Autophosphorylierung der IRAK woraufhin diese TRAF6 (TNF α -Rezeptor assoziierter Faktor) bindet (Cao et al. 1996). Dieser wiederum bindet und phosphoryliert den IKK (I κ B-Kinase-Komplex), welcher anschließend I κ B phosphoryliert. Nach folgender Ubiquitinierung löst sich das I κ B vom NF κ B-Dimer und wird im Proteasom abgebaut (DiDonato et al. 1997). NF κ B kann daraufhin in den Nukleus gelangen (Translokation) und dort über Bindung an das „ κ B enhancer element“ die Transkription von Zielgenen regulieren. Ein weiterer Weg zur Aktivierung von NF κ B ist durch Bindung von TNF α an den TNF-Rezeptor (TNFR) I. Dadurch wird das hemmende Molekül SODD („silencer of death domain“) vom Rezeptor gelöst, so dass das Adaptermolekül TRADD („TNFR I-associated death domain protein“) die Bindung von TRAF und RIP („receptor-interacting protein“) an

den Rezeptor vermitteln kann. Dieser TRADD-TRAF-RIP-Komplex kann ebenfalls IKK aktivieren und somit zu einer Aktivierung von NFκB führen.

Wichtige Zielgene des NFκB sind unter anderem Adhäsionsmoleküle, die die Leukozytenmigration beeinflussen (Lee et al. 1996), pro-inflammatorische Zytokine (Chen et al. 1995) und anti-inflammatorische Mediatoren, die die Entzündungsreaktion modulieren. Einer dieser anti-inflammatorischen Mediatoren ist das IκBα. Eine Aktivierung von NFκB führt also gleichzeitig zu einer vermehrten Bildung seines Inhibitors, wodurch sich dieser Transkriptionsfaktor selbst reguliert (Le Bail et al. 1993).

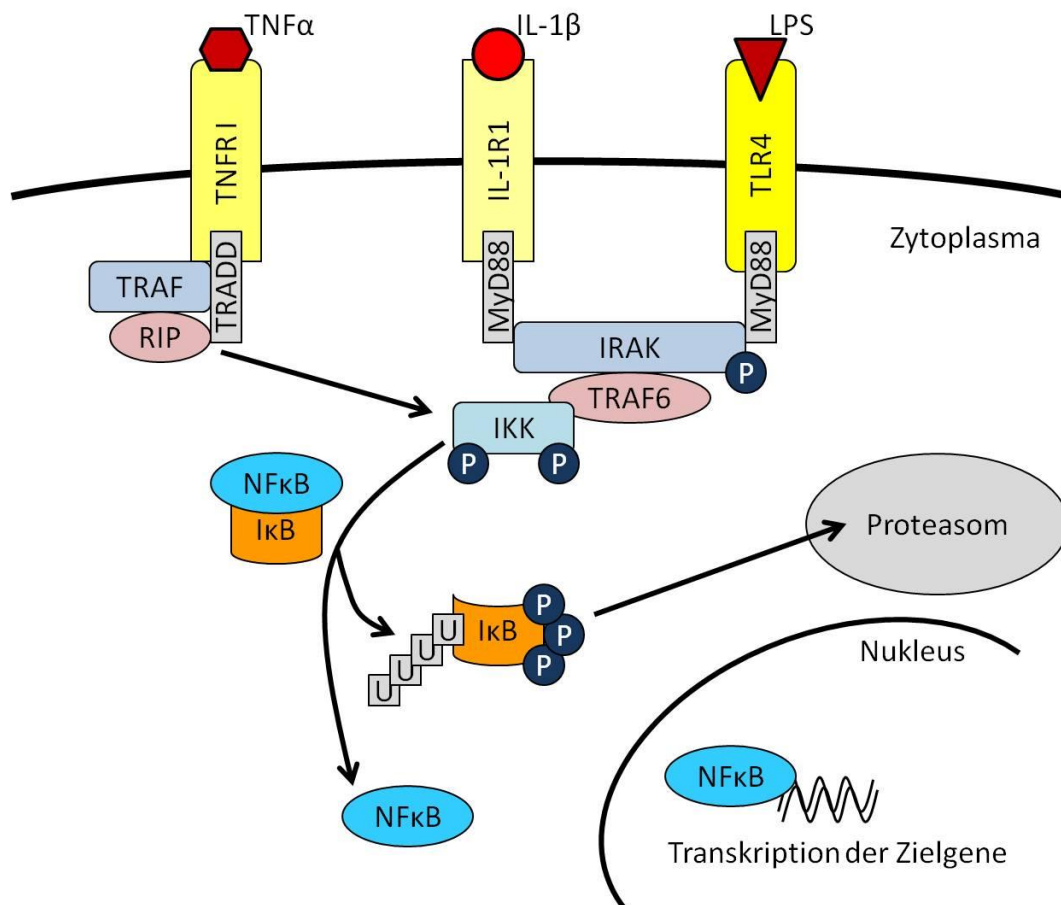


Abbildung I-3

Interleukin (IL)-1β, Lipopolysaccharid (LPS) oder Tumornekrosefaktor (TNF)α binden an ihre Rezeptoren, wodurch im Zytoplasma der Zelle eine Signalkaskade ausgelöst wird, durch die „nuclear factor“ (NF)κB aktiviert wird. Dadurch kann es in den Zellkern gelangen und dort die Transkription von Zielgenen regulieren. IκB = „inhibitor of κB“; IKK = IκB-Kinase-Komplex; IRAK = IL-1-Rezeptor assoziierte Kinase; MyD = „myeloid differentiation primary response

protein“; RIP = „receptor-interacting protein“; TRADD = „TNF-receptor I-associated death domain protein“; TRAF = „TNF-receptor associated factor“; TLR = toll-like Rezeptor; TNFR = TNF-Rezeptor; IL-1 R = IL-1-Rezeptor. Modifiziert nach (Conti et al. 2004).

2.1.4.2 *STAT3*

STAT3 liegt in inaktiven Zellen einzeln im Zytoplasma vor. Bindet IL-6 an den IL-6-Rezeptor einer Zelle, wird die JAK (Janus-Kinase), die auf der zytoplasmatischen Seite an den Rezeptor gekoppelt ist, aktiviert (Guschin et al. 1995). Diese phosphoryliert dann das STAT3. Durch die Phosphorylierung können die STAT-Moleküle dann Dimere bilden, die in den Nukleus gelangen und dort die Transkription von Zielgenen regulieren können (Kishimoto 1994). Auch bei dem JAK-STAT-Signalweg gibt es einen endogenen Inhibitor, dessen Transkription durch STAT3 reguliert wird: „Suppressor of cytokine signaling“ (SOCS)3 hemmt die JAK (Starr et al. 1997).

STAT3 kann außerdem durch IL-10 aktiviert werden (Finbloom und Winestock 1995), wodurch IL-10 wiederum modulierend auf das Entzündungsgeschehen wirken kann. Als typisches Zielgen dieses Transkriptionsfaktors wird die mikrosomale Prostaglandin E Synthase (mPGES) diskutiert (Rummel et al. 2011). Auch eine Korrelation zwischen der STAT3-Aktivierung und der Expression der Cyclooxygenase 2 (COX2) wurde bereits beschrieben. Da der COX2-Promotor jedoch keine Bindungsregion für STAT3 enthält, wird hier eine Beteiligung weiterer Transkriptionsfaktoren, z. B. NF-IL6, vermutet (Rummel et al. 2006).

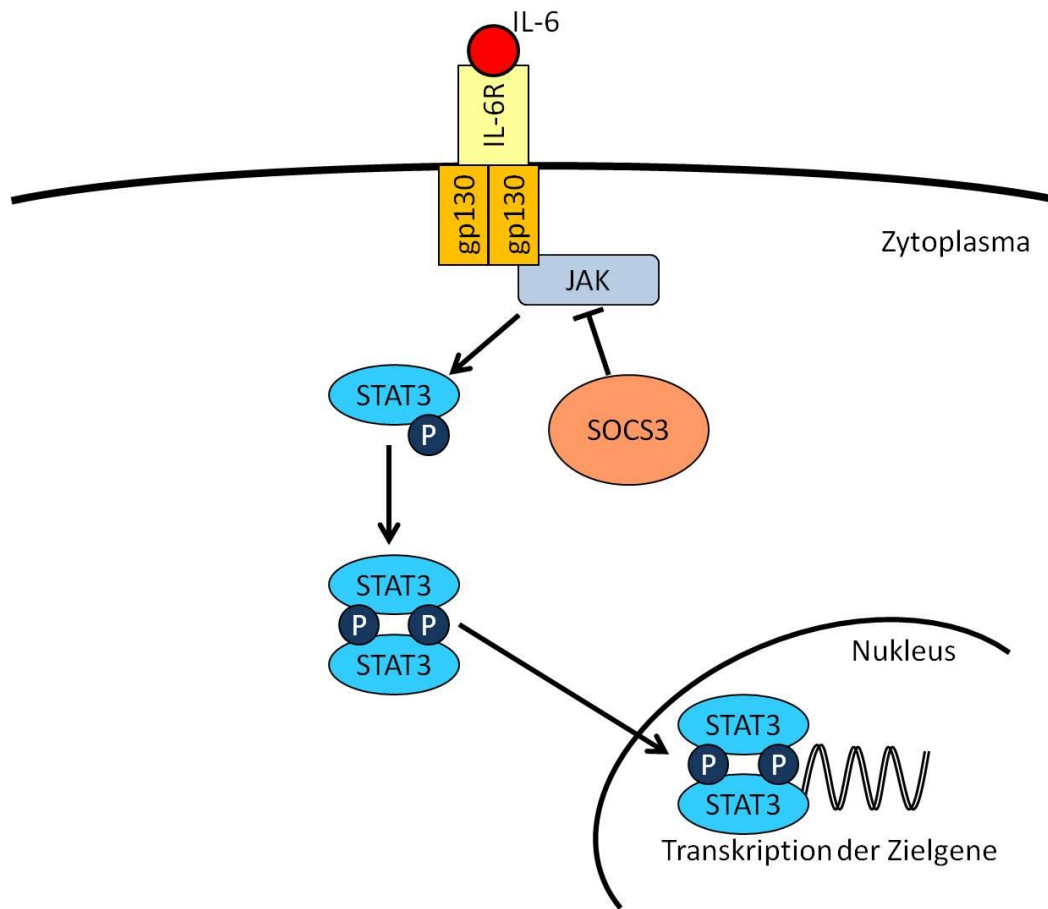


Abbildung I-4

Bindung von Interleukin (IL)-6 an seinen Rezeptor auf einer Zelle löst eine Signalkaskade aus, bei der der Transkriptionsfaktor STAT3 aktiviert wird. Gp130 = Glycoprotein 130; JAK = Janus-Kinase; SOCS = „suppressor of cytokine signaling“. Modifiziert nach (Tawara et al. 2011)

2.1.4.3 NF-IL6

Auch NF-IL6 ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor bei der Kommunikation zwischen dem Immunsystem und dem Gehirn. Da er für diese Arbeit eine besonders wichtige Rolle spielt, ist ihm ein eigenes Kapitel gewidmet (Kapitel I.3).

2.1.5 Zielgene

Die genomische Aktivierung der Zellen im ZNS führt zu einer vermehrten Expression von Zielgenen, die die Entstehung der „sickness response“ vermitteln. Die für diese Arbeit wichtigsten Zielgene sind die mPGES und die COX2 als wichtige, geschwindigkeitsbestimmende Enzyme der PGE2-Synthese, die induzierbare NO-

Synthase (iNOS), die Enzyme des Tryptophan-Metabolismus (siehe Kapitel I.5) sowie das CRH als Aktivator der HPA-Achse (siehe Kapitel I.4).

2.1.5.1 mPGES und COX2

Arachidonsäure wird durch die Phospholipase A₂ aus den Phospholipiden der Zellmembran abgespalten. Die COX2 synthetisiert Prostaglandin H₂ aus der Arachidonsäure, welches dann durch die mPGES zu Prostaglandin E₂ umgesetzt wird (siehe auch Abbildung I-5) (Ivanov und Romanovsky 2004). Sowohl die COX2 als auch die mPGES werden durch inflammatorische Zytokine induziert (Uematsu et al. 2002; Rummel et al. 2006). Es wurde auch eine Beteiligung von NF-IL6 an der mPGES-Expression nachgewiesen (Uematsu et al. 2002; Straccia et al. 2013).

PGE₂ vermittelt seine Wirkung über 4 Subtypen G-Protein-gekoppelter, 7-transmembranärer Rezeptoren (EP1 bis EP4) und ist einer der wichtigsten Mediatoren für die Entstehung von Fieber (Oka 2004). PGE₂-Level in Blut und Gehirn korrelieren direkt mit der Höhe des Fiebers (Sehic et al. 1996; Milton 1998). Außerdem kann PGE₂, das direkt in den Ventrikel oder in die präoptische Region gegeben wird, Fieber erzeugen (Milton und Wendlandt 1971; Scammell et al. 1996). Auch eine teilweise verminderte Futteraufnahme im Rahmen der „sickness response“ wird durch PGE₂ über den EP4-Rezeptor vermittelt (Ohinata et al. 2006; Pecchi et al. 2006).

Medikamentöse Inhibition der COX2 führt zu einer Fiebersenkung (Cao et al. 1997) und einer verminderten Anorexie im Rahmen der „sickness response“ (Swiergiel und Dunn 2002). COX2- oder mPGES-defiziente Mäuse zeigen außerdem eine reduzierte Fieberantwort auf LPS-Injektion (Li et al. 1999; Engblom et al. 2003).

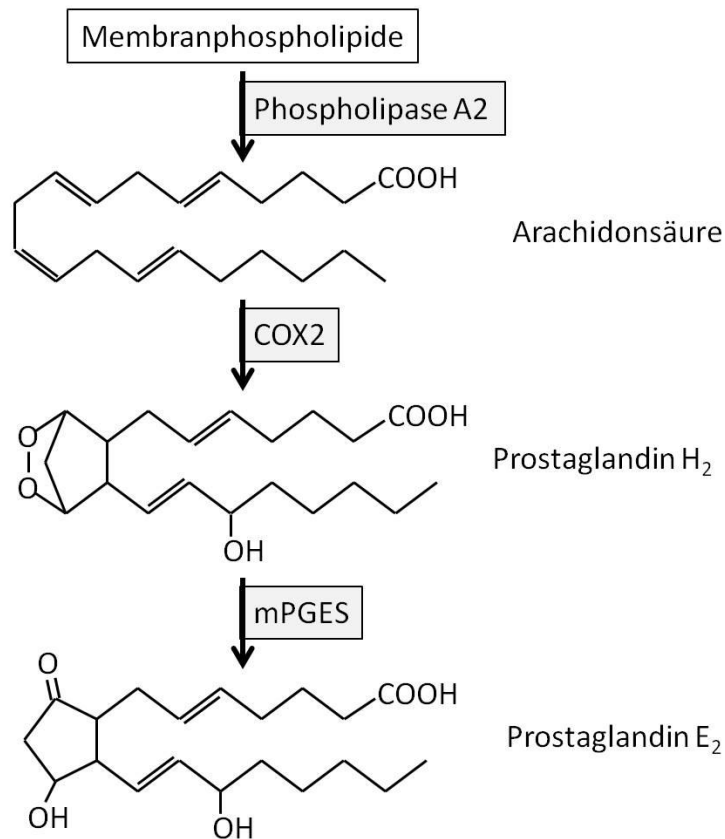


Abbildung I-5

Die Phospholipase A₂ löst Arachidonsäure aus der Zellmembran. Die Cyclooxygenase 2 (COX2) wandelt Arachidonsäure zu Prostaglandin H₂ um, welches anschließend durch die mikrosomale Prostaglandin E Synthase (mPGES) zu Prostaglandin E₂ umgewandelt wird. Modifiziert nach (Ivanov und Romanovsky 2004).

2.1.5.2 *iNOS*

Es gibt drei verschiedene Isoformen der NO-Synthase, die im ZNS Stickstoffmonoxid (NO) produzieren: eine neuronale (nNOS), eine endotheliale (eNOS) und eine induzierbare Form (iNOS) (Griffith und Stuehr 1995). Für diese Arbeit ist hauptsächlich die iNOS von Interesse. Die induzierbare NO-Synthase wird nach Stimulation mit LPS oder inflammatorischen Zytokinen in Endothelzellen (Mandi et al. 1998), Gliazellen (Corradin et al. 1993) und in Neuronen (Small et al. 2004) insbesondere des PVN und des Arc (Wong und Billiar 1995) gebildet. Studien mit selektiven iNOS-Inhibitoren haben eine Beteiligung der iNOS an LPS-induzierter Anorexie, verminderter Wasseraufnahme und reduzierter Aktivität gezeigt (Riediger et

al. 2010; Borner et al. 2012). Im PVN hingegen kann NO die Ausschüttung von CRH hemmen (Turnbull et al. 1998) und moduliert somit die Aktivität der HPA-Achse.

Die Rolle der iNOS bzw. des NO für die Fieberentstehung hingegen ist umstritten. NOS-Inhibitoren können sowohl hemmend (Roth et al. 1999; Soszynski 2001) als auch verstärkend (Gourine 1995; Almeida et al. 1999) auf die LPS-induzierte Fieberantwort wirken. Auch die konstitutiv exprimierte NOS-Isoform nNOS scheint bei der Regulation der Fieberantwort eine Rolle zu spielen (Perotti et al. 1999). INOS-defiziente Mäuse zeigen reduziertes LPS-induziertes Fieber, jedoch unverändertes Fieber nach Turpentin-Injektion (ein Modell für Abszesse) (Kozak und Kozak 2003).

2.2 Der zelluläre Signalweg

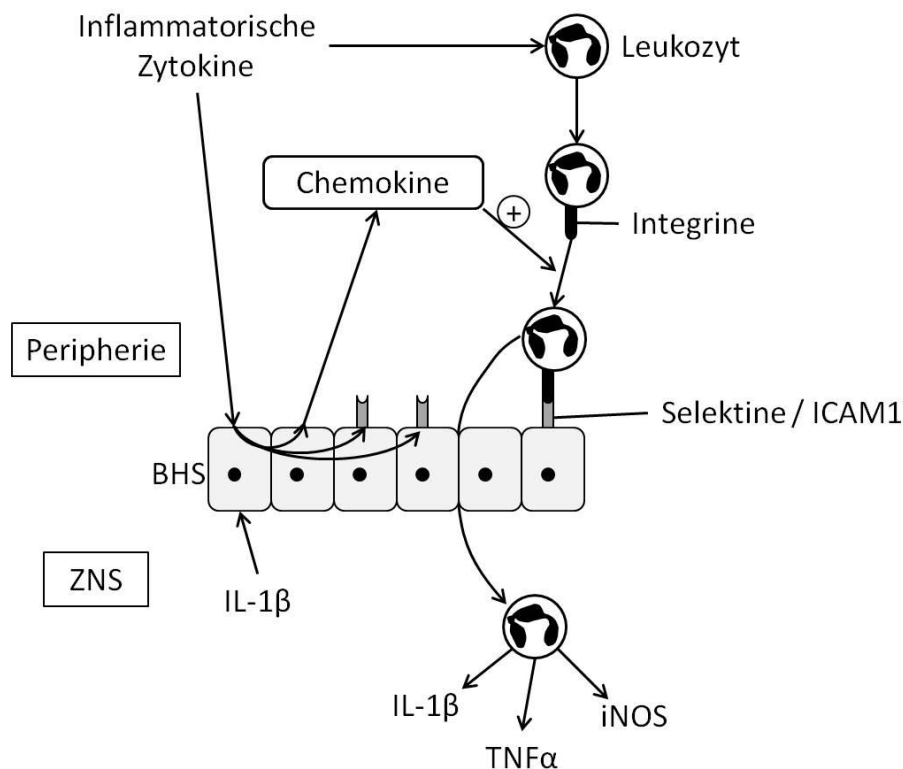


Abbildung I-6

Übersicht über den zellulären Signalweg. Periphere inflammatorische Zytokine aktivieren Leukozyten, die daraufhin Integrine wie ICAM1 („intracellular cell adhesion molecule 1“) exprimieren. Die Zytokine aktivieren außerdem, ebenso wie zentrales Interleukin (IL)-1 β , die Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke (BHS). Diese exprimieren daraufhin Chemokine, die die Leukozyten in die Gehirngefäße locken, und Selektine sowie ICAM1. Dadurch können die

Leukozyten an die Endotheloberfläche binden, mittels Diapedese ins Gehirnparenchym gelangen und dort weitere Mediatoren produzieren.

Periphere Leukozyten können durch pro-inflammatorische Zytokine wie z. B. IL-1 β , IL-6 oder TNF α aktiviert werden (Gery et al. 1972; Mullen et al. 1995). Auch eine direkte Aktivierung über die Bindung von PAMPs an verschiedene Adhäsionsmoleküle auf der Leukozyten-Oberfläche ist möglich (Flaherty et al. 1997). Die Aktivierung führt dabei zu einer vermehrten Expression von Integrinen sowie inflammatorischen Mediatoren in den Leukozyten (Tiku et al. 1986; Dubravec et al. 1990; Lynn et al. 1991). Des Weiteren können die peripheren inflammatorischen Mediatoren sowie PAMPs auch Endothelzellen der Blutgefäße des Gehirns aktivieren (siehe auch Kapitel I.2.1.2.1). Für die Aktivierung sowohl der Endothelzellen als auch der Leukozyten durch LPS ist hauptsächlich der TLR4 verantwortlich. So zeigen TLR4-Knockout-Mäuse keine Adhäsion von Leukozyten an Blutgefäße des Gehirns nach LPS-Gabe (Zhou et al. 2009). Eine Aktivierung der Endothelzellen kann auch indirekt über zentral gebildetes IL-1 β erfolgen. Erhöhte IL-1 β -Expression im Gehirn führt zu einer vermehrten Rekrutierung von Leukozyten ins Gehirn (Shaftel et al. 2007). Aktivierte Endothelzellen exprimieren vermehrt Adhäsionsmoleküle wie z. B. P- und E-Selektine und Integrine wie unter anderem das „intracellular cell adhesion molecule“ 1 (ICAM1) (Prudhomme et al. 1996) sowie Chemokine wie z. B. CXCL1, CCL2, CCL3 und CCL4 (Shukaliak und Dorovini-Zis 2000; Chui und Dorovini-Zis 2010; Roy et al. 2012). Die Chemokine induzieren eine vermehrte Migration von Leukozyten in die Blutgefäße des Gehirns. Dort vermitteln die Selektine zuerst eine lockere, anschließend die Integrine wie ICAM1 eine feste Bindung der Leukozyten an die Endothelzellen. Die Rolle von ICAM1 für diesen Vorgang wurde in ICAM1-defizienten Mäusen bestätigt, die eine deutlich verminderte Leukozyten-Adhäsion an Gehirn-Endothelien nach LPS-Gabe zeigten (Bohatschek et al. 2001). Diese Adhäsion der Leukozyten an das Endothel ist der erste Schritt für eine Extravasation von Leukozyten ins Parenchym (von Wedel-Parlow et al. 2011), wo sie inflammatorische Mediatoren sezernieren wie z. B. IL-1 β , TNF α und iNOS und somit weitere Zellen aktivieren können (Tiku et al. 1986; Dubravec et al. 1990; Garcia-Bonilla et al. 2014).

Die Extravasation der Leukozyten ist jedoch von der Stärke des inflammatorischen Stimulus abhängig, sie tritt z. B. nur nach hohen LPS-Dosen verstärkt auf (Bohatschek et al. 2001).

2.2.1 Neutrophile Granulozyten

Etwa 90 % der Leukozyten, die bei systemischen Entzündungen ins Gehirn einwandern, sind neutrophile Granulozyten. Die wichtigsten Chemokine sind dabei CXCL1 und CXCL2. Die Einwanderung der Granulozyten ins Gehirn beginnt etwa 12 h nach dem inflammatorischen Insult und erreicht nach etwa 24 h ein Plateau (Bohatschek et al. 2001). NG tragen zur Entstehung der „sickness response“ bei, insbesondere zu Veränderungen im Sozialverhalten (Aguilar-Valles et al. 2014). Des Weiteren können sie ischämische Hirnschädigungen verstärken (Garcia-Bonilla et al. 2014) und sogar selbst zytotoxisch wirken (Allen et al. 2012). Sie können jedoch auch anti-inflammatorisch wirken, indem sie IL-1ra produzieren (Schroder et al. 2006) und dadurch sowie durch die Produktion von iNOS (Garcia-Bonilla et al. 2014) die Aktivierung der HPA-Achse modulieren (siehe auch Kapitel I.4).

2.2.2 Monozyten / Makrophagen

Peripheres TNF α stimuliert beispielsweise Mikroglia zur Produktion von CCL2. Dieses ist das wichtigste Chemokin zur Anlockung von Monozyten ins Gehirn. Die Monozyten bzw. Makrophagen siedeln sich im Gehirn hauptsächlich perivaskulär und periventrikulär an, insbesondere z. B. im SFO und im Hippocampus. Im Rahmen der „sickness response“ konnte gezeigt werden, dass in das Gehirn einwandernde Makrophagen mitverantwortlich für Veränderungen des Sozialverhaltens während peripherer Entzündungsreaktionen sind (D'Mello et al. 2009). Zusätzlich wird auch eine Rolle von Makrophagen für die Beseitigung geschädigten Gewebes und für die Unterstützung der Gewebs-Regeneration nach ischämischer Hirnschädigung diskutiert (Shichita et al. 2014).

2.2.3 Auswirkungen von Neutropenie

Mit einem Anteil von 90 % an den bei systemischen Entzündungen ins Gehirn einwandernden Leukozyten spielen neutrophile Granulozyten eine wichtige Rolle im

zellulären Kommunikationsweg zwischen Immunsystem und ZNS. Bei Patienten unter Chemotherapie tritt als Therapie-bedingte Nebenwirkung häufig eine Neutropenie auf. Die Auswirkungen dieses Fehlens von NG auf das Krankheitsgeschehen und die „sickness response“ sind also von großem Interesse.

Werden Ratten mit dem Zytostatikum Cyclophosphamid behandelt, entwickeln sie eine Leukopenie. Dabei ist die Zahl der NG sehr stark, die Zahl der Lymphozyten und Monozyten weniger ausgeprägt vermindert (Minano et al. 2004). Nach Induktion einer systemischen Entzündung durch LPS zeigen diese Tiere, gegenüber immunkompetenten Tieren, verminderte Plasmalevel von IL-1 β und PGE₂, jedoch eine verlängerte Fieberreaktion (Tavares et al. 2006). Tiere mit einer Antikörper-induzierten Neutropenie reagieren auf LPS-Gabe mit, gegenüber nicht-neutropenen Tieren, erhöhten TNF α -Plasmaspiegeln (Daley et al. 2005). Im Hypothalamus hingegen ist eine Verminderung der IL-1 β -Expression beschrieben. Außerdem zeigen diese Tiere vermindertes LPS-induziertes depressives Verhalten sowie eine Verminderung der LPS-induzierten Änderungen des Sozialverhaltens (Aguilar-Valles et al. 2014).

Die genauen Mechanismen, wie sich Neutropenie auf die Entstehung der „sickness response“ auswirkt, sind jedoch noch nicht geklärt.

2.3 Der nervale Signalweg

Der nervale Signalweg wird in dieser Arbeit nicht untersucht. Er wird hier nur der Vollständigkeit halber kurz erwähnt.

Wie bereits in Kapitel I.2.1.1 beschrieben, sind die peripheren inflammatorischen Zytokine eher an der Aufrechterhaltung als an der Initiierung der Fieberantwort beteiligt. Zusätzlich tritt die erste Fieberphase bereits auf, bevor große Mengen inflammatorischer Zytokine im Blut messbar sind. Aus diesen Gründen wurde ein weiterer, schneller Kommunikationsweg zwischen Immunsystem und ZNS vermutet (Ross et al. 2000). Dabei aktiviert LPS afferente Fasern von sensorischen Hautnerven (Ross et al. 2000; Rummel et al. 2004) und des *nervus vagus* (Blatteis 2006), die daraufhin über die AP in die präoptische Region projiziert werden und somit an der

frühen Fieberentstehung beteiligt sind. Eine subdiaphragmatische Vagotomie ebenso wie eine Lokalanästhesie von Hautnerven verhindert bzw. verringert die Fieberantwort (Sehic und Blatteis 1996; Goldbach et al. 1997; Ross et al. 2000).

3. Der Transkriptionsfaktor NF-IL6

3.1 Struktur

Der Transkriptionsfaktor NF-IL6 wurde ursprünglich als Protein entdeckt, das die IL-1-abhängige Transkription von IL-6 vermittelt (Isshiki et al. 1990). Er gehört zur Superfamilie der bZip-Transkriptionsfaktoren. Diese enthalten am C-terminalen Ende eine basische Region, die der Bindung an die DNA dient, und einen Leucin-Zipper, mit dessen Hilfe die Transkriptionsfaktoren dimerisieren können (Poli et al. 1990). NF-IL6 gehört außerdem zu einer Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die bevorzugt an die Gensequenz CCAAT im Promotor eines Gens binden, den „CCAAT/enhancer-binding-proteins“ (C/EBP). Ein Synonym für NF-IL6 ist daher C/EBP β (Akira et al. 1990). Am N-terminalen Ende des NF-IL6 liegt die Transkriptions-Aktivierungs-Domäne, die die transkriptionale Antwort kontrolliert. Dazwischen enthält NF-IL6 zwei regulatorische Domänen, die Angriffspunkt für Phosphorylierungen sind (Li et al. 2007). Durch Phosphorylierungen kann die Tertiärstruktur und damit die Aktivität von NF-IL6 modifiziert werden (Trautwein et al. 1993; Williams et al. 1995).

NF-IL6 kommt in drei verschiedenen Isoformen vor: „liver-enriched activating protein“ (LAP) 1 besteht in der Maus aus 297 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 38 kDa. LAP 2 fehlen N-terminal 21 Aminosäuren (Molekulargewicht 34 kDa), wodurch es eine erhöhte transkriptionale Aktivität besitzt als LAP 1. „Liver-enriched inhibitory protein“ (LIP) fehlt bei einem Molekulargewicht von 20 kDa die gesamte Transkriptions-Aktivierungs-Domäne sowie Teile der regulatorischen Domänen. Es fungiert daher oft als dominant negativer Inhibitor. Die unterschiedlichen Isoformen entstehen durch Initiation der Translation von NF-IL6 an verschiedenen Start-Codons (Zahnow 2009). Das Verhältnis zwischen LIP und LAP kann durch verschiedene Signalmoleküle beeinflusst werden. IFN β z. B. induziert eine erhöhte Expression von LIP, wodurch die Virusreplikation bei Infektionen mit dem

„simian immunodeficiency virus“ gehemmt werden kann (Ravimohan et al. 2010). Auch durch „eucaryotic initiation factor“ (eIF) 2 α und 4E kann *in vitro* eine vermehrte LIP-Expression erreicht werden (Calkhoven et al. 2000). Im Rahmen von Brustkrebs-Erkrankungen wird außerdem vermutet, dass eine Aktivierung des „epidermal growth factor receptor“ (EGFR) zu einer Erhöhung des LIP:LAP-Verhältnisses führt, wodurch die Proliferation und Metastasierung des Tumors gefördert wird (Zahnow 2009).

Den in dieser Arbeit verwendeten NF-IL6-Knockout-Mäusen fehlen der Leucin-Zipper und Teile der basischen Region des NF-IL6.

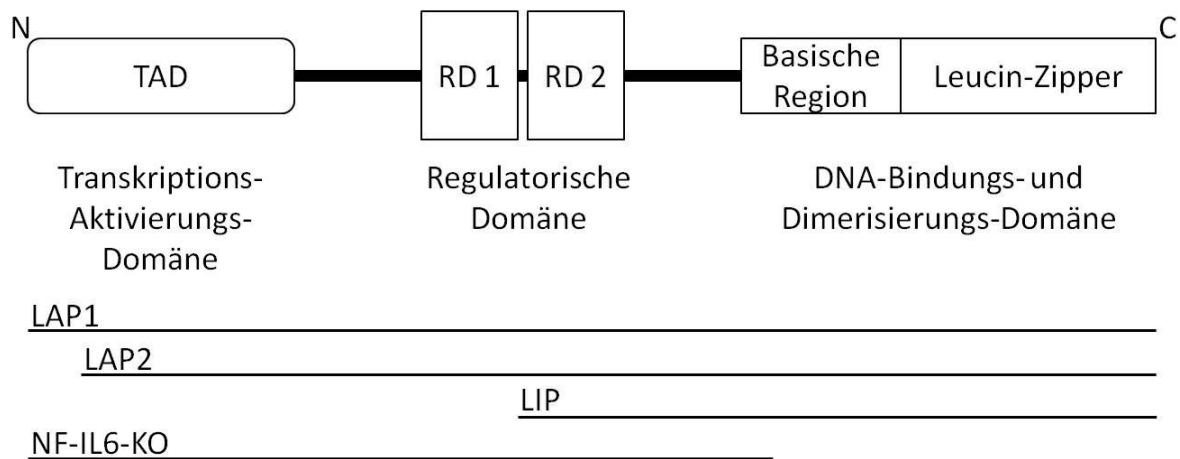


Abbildung I-7

Der Transkriptionsfaktor „nuclear factor interleukin 6“ (NF-IL6) enthält N-terminal eine Transkriptions-Aktivierungs-Domäne (TAD) und C-terminal einen Leucin-Zipper als Dimerisierungs-Domäne sowie eine basische Region zur DNA-Bindung. Dazwischen befinden sich zwei regulatorische Domänen (RD). NF-IL6 kommt in drei Isoformen vor: LAP1 besteht aus 297 Aminosäuren, LAP2 fehlen N-terminal 21 Aminosäuren und LIP fehlen die Transkriptions-Aktivierungs-Domäne und Teile der regulatorischen Domäne. Den in dieser Studie verwendeten NF-IL6-Knockout-Mäusen fehlen der Leucin-Zipper und Teile der basischen Region. Modifiziert nach (Li et al. 2007).

3.2 Bedeutung

NF-IL6 kommt in vielen verschiedenen Geweben und Zellen vor, z. B. in Lunge, Leber, Magen-Darm-Trakt, Fettgewebe, Mamma, Gehirn, Milz, Niere, Plazenta und in Leukozyten. Er spielt eine wichtige Rolle für Metabolismus, Zellproliferation und -Differenzierung (Ramji und Foka 2002). In diesem Zusammenhang ist auch eine

erhöhte NF-IL6-Expression in Tumoren beschrieben, weshalb eine Rolle von NF-IL6 für die Tumorentstehung oder Metastasierung vermutet wird (Zhu et al. 2002; Carro et al. 2010; Aguilar-Morante et al. 2011). Im braunen Fettgewebe ist NF-IL6 für die Thermogenese wichtig; in NF-IL6-Knockout-Mäusen ist die Thermogenese entsprechend reduziert (Carmona et al. 2005). Weitere Funktionen umfassen die Ausbildung des Langzeitgedächtnisses (Taubenfeld et al. 2001) und Prozesse im Rahmen eines Entzündungsgeschehens (s. u.). Nicht zuletzt aufgrund dieser vielfältigen Funktionen wird auch eine Beteiligung von NF-IL6 an verschiedenen Krankheiten vermutet, z. B. bei Gehirnschäden nach einem Schlaganfall (Kapadia et al. 2006), Alzheimer und amyotropher Lateralsklerose (Strohmeyer et al. 2014).

3.2.1 Bedeutung von NF-IL6 bei Inflammation

Bei systemischen Entzündungen wird die Expression von NF-IL6 in verschiedenen Zelltypen induziert, z. B. in Neuronen (Sterneck und Johnson 1998), Astrozyten (Ejarque-Ortiz et al. 2007), Endothelzellen und perivaskulären Makrophagen im Gehirn (Damm et al. 2011) sowie in Hepatozyten (Isshiki et al. 1991) und Leukozyten (Cloutier et al. 2009). Diese Induktion der Expression kann sowohl direkt über LPS als auch indirekt durch inflammatorische Mediatoren wie IL-1 β , IL-6 oder TNF α vermittelt werden (Cardinaux et al. 2000; Tengku-Muhammad et al. 2000). Sie beginnt etwa 6 bis 8 h nach Beginn der systemischen Entzündung. Deshalb und aufgrund der Zielgene, die durch NF-IL6 abgelesen werden, wurde vermutet, dass NF-IL6 auch eine Rolle bei der Aufrechterhaltung oder Beendigung der Fieberantwort spielt (Damm et al. 2011). Auch eine Induktion durch neuronale Aktivität (Sun et al. 2007) oder Hypoxie (Hehlhans et al. 2001) ist möglich. Wichtige Zielgene von NF-IL6 sind unter anderem IL-1 β (Zhang und Rom 1993), IL-6 (Akira et al. 1990), iNOS (Dlaska und Weiss 1999), COX2, mPGES (Straccia et al. 2013) und TNF α (Pope et al. 1994). Auch ICAM1 (Catron et al. 1998; Manzel et al. 2009) und verschiedene chemotaktische Zytokine wie z. B. CCL3 und 4 sind Zielgene von NF-IL6 (Zhang et al. 2010), weshalb eine Beteiligung von NF-IL6 an der Rekrutierung von Leukozyten zum Gehirn vermutet wird. Bei zerebraler Ischämie zeigen NF-IL6-defiziente Mäuse beispielsweise weniger in das Gehirn einwandernde neutrophile Granulozyten

(Kapadia et al. 2006). Zusätzlich wird vermutet, dass NF-IL6 auch bei der Aktivierung der HPA-Achse eine Rolle spielen könnte, da dieser Transkriptionsfaktor sowohl direkt (Stephanou et al. 1997) als auch indirekt über die Bildung von NO (Akasaka et al. 2006) die Expression von CRH im PVN regulieren kann. Auch eine Rolle bei der Freisetzung von POMC aus der Hypophyse wird vermutet (Abbud et al. 2004).

Obwohl also bereits beschrieben wurde, dass NF-IL6 an verschiedenen inflammatorischen Prozessen beteiligt ist oder sein könnte, ist die genaue Rolle von NF-IL6 für die Entstehung der „sickness response“ sowie für die Kommunikation zwischen peripherem Immunsystem und Gehirn weiterhin unklar.

3.2.2 NF-IL6-KO-Mäuse

NF-IL6-Knockout-Mäuse zeigen einen gestörten Glucose- und Fett-Stoffwechsel (Liu et al. 1999; Wang et al. 2000). Damit einher gehen eine reduzierte Menge an Fettgewebe sowie reduzierte Leptin-Spiegel (Wang et al. 2000). Die Thermogenese im braunen Fettgewebe ist ebenfalls gestört, da die KO insgesamt weniger braunes Fettgewebe sowie weniger Triglyceride, die der „Treibstoff“ für die zitterfreie Thermogenese sind, aufweisen. Auch das für die zitterfreie Thermogenese wichtige „uncoupling protein“ (UCP)1 wird in den KO weniger aktiviert (Carmona et al. 2005). Aus diesen Gründen zeigen die KO eine erhöhte Kälteempfindlichkeit. Die Tiere weisen außerdem erhöhte IL-6-Plasmalevel auf, wodurch es zu Splenomegalie, Lymphadenopathie und bei älteren Tieren zu lympho- und myeloproliferativen Störungen ähnlich der „Castleman’s disease“ beim Menschen kommen kann (Screpanti et al. 1995). Des Weiteren ist die Funktion von T-Helfer-Zellen sowie Makrophagen gestört, woraus eine erhöhte Empfänglichkeit für verschiedene Infektionen, z. B. durch *Candida albicans*, zu erklären ist (Screpanti et al. 1995; Tanaka et al. 1995).

3.3 Signaltransduktion

Um ihre biologische Aktivität zu entwickeln, müssen einzelne NF-IL6-Moleküle zunächst dimerisieren. Dazu lagern sich je zwei Moleküle an ihren Leucin-Zippen zusammen und bilden so ein scherenförmiges Dimer. Dieses kann als Homodimer aus

zwei gleichen Molekülen oder als Heterodimer aus unterschiedlichen Isoformen des NF-IL6 oder auch aus NF-IL6 zusammen mit einem anderen Transkriptionsfaktor bestehen.

Im Ruhezustand liegt NF-IL6 als unterdrückter Transkriptionsfaktor vor. Negative regulatorische Regionen maskieren dabei die aktivierende Domäne des NF-IL6 (Williams et al. 1995). Durch Aktivierung verschiedener Signalwege kommt es zu einer Phosphorylierung von NF-IL6, wodurch die Tertiärstruktur verändert und die aktivierende Domäne freigegeben wird. Auch die Translokation in den Nukleus sowie die DNA-Bindung können dadurch ermöglicht bzw. erhöht werden. Nach Bindung von IL-6 an den IL-6R kommt es z. B. über JAK und verschiedene Adapterproteine zu einer Aktivierung der „mitogen-activated protein“ (MAP)-Kinase-Kaskade. Diese aktiviert „extracellular-signal regulated kinase“ (ERK)-1 und -2, welche anschließend NF-IL6 am Threonin-235 phosphorylieren (Nakajima et al. 1993). Dadurch wird das transaktivierende Potential von NF-IL6 gesteigert. ERK-1 und -2 können außerdem die p90/RSK („ribosomal s6 kinase“) phosphorylieren, woraufhin diese wiederum NF-IL6 am Threonin-217 phosphoryliert. Durch diesen Vorgang wird die DNA-Bindungsfähigkeit von NF-IL6 z. B. an den COX2-Promotor erhöht (Cieslik et al. 2005). Auch verschiedene Proteinkinasen können an der Aktivierung von NF-IL6 mitwirken. Proteinkinase A z. B. kann die *de novo* Synthese von NF-IL6 sowie die Translokation in den Nukleus anregen (Chinery et al. 1997; Schwaninger et al. 2000). Die Proteinkinase C hingegen kann die DNA-Bindungsfähigkeit von NF-IL6 vermindern (Mahoney et al. 1992) oder modulierend in andere Signalwege der NF-IL6-Phosphorylierung eingreifen (Cieslik et al. 2005). Auch eine aktivierende Wirkung von Proteinkinase G wurde bereits beschrieben, wobei diese jedoch auf einer Dephosphorylierung beruht (Zhao et al. 2005).

Im Nukleus binden die basischen Regionen der NF-IL6-Dimere dann an die Promotoren der Zielgene in der DNA und regulieren so deren Transkription.

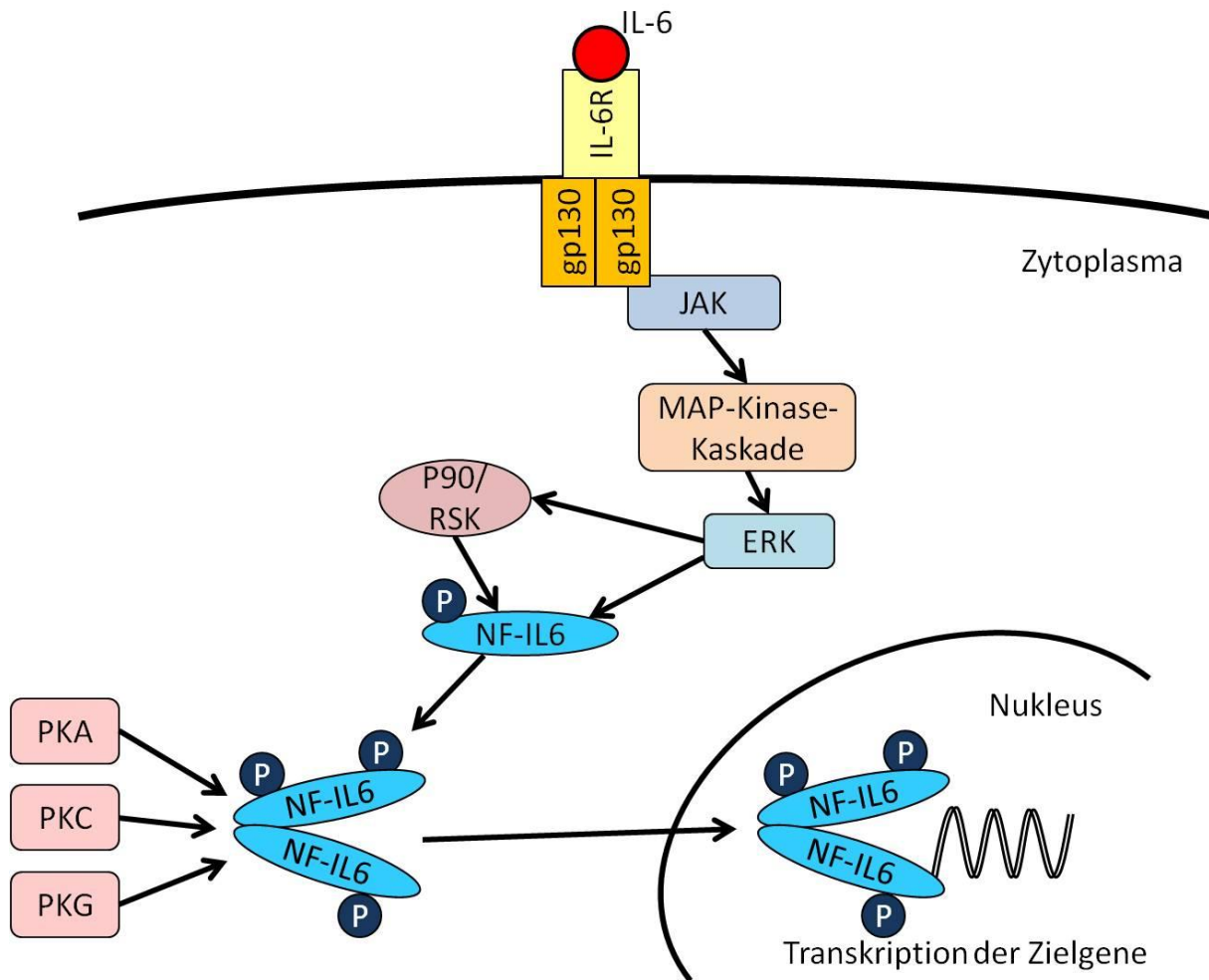


Abbildung I-8

Bindung von Interleukin (IL)-6 an seinen Rezeptor aktiviert die Janus-Kinase (JAK), woraufhin die MAP („mitogen-activated protein“-)Kinase-Kaskade ausgelöst wird. Diese aktiviert die „extracellular-signal regulated kinase“ (ERK), die daraufhin direkt oder indirekt über Aktivierung der p90//RSK („ribosomal s6 kinase“) die Phosphorylierung von „nuclear factor“ (NF)-IL6 vermittelt. Phosphoryliertes NF-IL6 bildet scherenförmige Dimere, die in den Nukleus translozieren und dort die Transkription von Zielgenen regulieren können. Die Phosphorylierung von NF-IL6 kann zudem durch die Protein-Kinasen (PK) A, C und G beeinflusst werden.

3.4 Regulation

Die Aktivität von NF-IL6 kann durch das Zusammenwirken mit anderen Transkriptionsfaktoren beeinflusst werden („cross talk“) (Agrawal et al. 2003). Für die IL-6-abhängige Induktion der NF-IL6-Expression ist z. B. eine Beteiligung von STAT3 beschrieben. STAT3 bindet dabei an Adapterproteine, die an das cAMP-

responsive Element des NF-IL6-Promotors gebunden sind und beeinflusst somit dessen Expression (Niehof et al. 2001). NF-IL6 wiederum kann ebenfalls die Aktivität anderer Transkriptionsfaktoren modulieren. So kann NF-IL6 über eine Induktion von SOCS3 (Yarwood et al. 2008) oder eine Hemmung von I κ B α (Cappello et al. 2009) die Aktivität von NF κ B und STAT3 regulieren. Des Weiteren kann NF-IL6 Heterodimere mit anderen Transkriptionsfaktoren bilden. Diese können unterschiedliche Aktivität aufweisen. Heterodimere aus NF-IL6 und NF κ B zum Beispiel können die Transkription von IL-6 induzieren (LeClair et al. 1992; Matsusaka et al. 1993), während Dimere aus NF-IL6 und Fos oder Jun eine verminderte Fähigkeit aufweisen, DNA zu binden (Hsu et al. 1994).

Eine Inhibition der NF-IL6-Aktivität kann über die kurze Isoform LIP erfolgen, da diese zwar die DNA binden kann, ihr jedoch die Aktivierungs-Domäne fehlt. LIP kann deshalb dominant-negative Dimere mit LAP bilden (Descombes und Schibler 1991). Auch eine Hemmung der aktiven NF-IL6-Isoformen durch Konkurrenz um die DNA-Bindungsstellen ist möglich (Ossipow et al. 1993). Es gibt jedoch auch Hinweise, dass LIP z.T. aktivierend wirken kann. Die Expression einiger Akute-Phase-Proteine in der Leber z. B. kann durch LIP angeregt werden (An et al. 1996). Außerdem kann die bZIP-Domäne des LIP mit einer Domäne des NF κ B interagieren und dadurch, zumindest teilweise, den IL-6-Promotor aktivieren (Stein et al. 1993; Hu et al. 2000).

Eine weitere Möglichkeit der Inhibition von NF-IL6 ist die nukleär vorkommende Serin/Threonin-Kinase Tribbles 1 (Trib1). Diese kann MAP-Kinasen binden und so deren Aktivität regulieren (Kiss-Toth et al. 2004). Somit kann Trib1 die Phosphorylierung von NF-IL6 beeinflussen. Auch eine direkte Bindung an NF-IL6 wurde bereits beschrieben (Yamamoto et al. 2007). Trib1-defiziente Mäuse zeigen erhöhtes Vorkommen und erhöhte Aktivität von NF-IL6, während eine Trib1-Überexpression zu vermindertem NF-IL6 führt (Yamamoto et al. 2007). Inflammatorische Stimuli induzieren die Expression von Trib1 (Sung et al. 2006), so dass es als Modulator der inflammatorischen Antwort fungiert.

Zusätzlich kann auch die micro RNA (miR)155 NF-IL6 hemmen. Micro RNAs sind kleine RNA-Moleküle mit meist regulatorischer Wirkung auf die Genexpression. MiR155 kann an die 3'UTR-Region der NF-IL6-mRNA binden und somit deren Translation inhibieren (He et al. 2009). Die Expression der miR155 wird durch inflammatorische Zytokine, insbesondere TNF α reguliert (O'Connell et al. 2007). Während Entzündungsreaktionen hemmt sie außerdem die Expression mehrerer Matrix-Metalloproteinasen und schützt das Gehirn so vor Gewebsschädigungen (Faraoni et al. 2009).

3.4.1 Beeinflussung der NF-IL6-Aktivität

Verschiedene Stoffe können NF-IL6 beeinflussen. Blaubeerextrakt (Song et al. 2013), Parthenolide (Rummel et al. 2011), die z. B. in Mutterkraut vorkommen, und Curcumin (Balasubramanian und Eckert 2004), das in Gelbwurz vorkommt, bewirken eine verminderte Expression von NF-IL6. Mit Glucocorticoiden hingegen, kann die DNA-Bindung von NF-IL6 erhöht werden (Berg et al. 2002). (-)-Epigallocatechin-3-gallat, ein Inhaltsstoff von grünem Tee, kann die Expression von NF-IL6 erhöhen (Balasubramanian und Eckert 2004). Es gibt also verschiedene Möglichkeiten, die NF-IL6-Aktivität zu beeinflussen, wodurch es auch als mögliches therapeutisches Ziel in Frage kommt.

4. Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse

4.1 Anatomischer Aufbau

Die HPA-Achse ist ein weiteres wichtiges System in der Kommunikation zwischen Immunsystem und Gehirn. Ihre erste Station ist der Hypothalamus. Diese Gehirnregion ist wichtig für verschiedene Funktionen wie z. B. Energie-, Wasser- und Elektrolythaushalt und circadiane Rhythmik (Stephan und Zucker 1972; Haibara et al. 1994; Dev et al. 2012). Sie erhält Informationen von Sinnesorganen und aus dem limbischen System und steuert körperliche Reaktionen darauf (Barone et al. 1981). Für die HPA-Achse ist insbesondere der PVN wichtig. Er erhält Afferenzen aus verschiedenen Gehirnregionen, z. B. SFO, Arc, OVLT und dem SCN, wo circadiane Rhythmen gesteuert werden. Efferente Verbindungen gibt es unter anderem zur ME

und dem Hypophysenvorderlappen. Bei entsprechender Stimulation produziert der PVN CRH. Dieses gelangt anschließend über den *tractus tuberohypophyseus* an die ME, wo es in das Portalvenensystem abgegeben wird und so schließlich zum Hypophysenvorderlappen gelangt. In der Hypophyse bewirkt CRH die Spaltung von Proopiomelanocortin (POMC) zu ACTH, welches dann ins Blut abgegeben wird. ACTH bewirkt schließlich eine Freisetzung von Corticosteron (bzw. je nach Tierart anderen Glucocorticoiden) aus der Nebennierenrinde (Nickel et al. 2004).

4.2 Aktivierung

Eine Aktivierung der HPA-Achse kann sowohl durch inflammatorische Stimuli als auch durch psychologische Stressoren erfolgen (Fuchs et al. 2013). Bei systemischer Entzündung wird die Aktivierung der HPA-Achse sowohl über sCVO als auch über inflammatorische Zytokine vermittelt. Läsionen des SFO führen zu keiner Veränderung des ACTH-Plasmaspiegels nach IL-1 β -Gabe, so dass dem SFO eher eine untergeordnete Rolle zugeordnet werden kann (Katsuura et al. 1990). Die Rolle des OVLT hingegen ist umstritten. Läsionen des OVLT führen zu einer Erhöhung der IL-1 β -induzierten ACTH-Spiegel im Blut (Katsuura et al. 1990), während chirurgische Unterbrechung der Verbindung zwischen OVLT und PVN keinen Einfluss hat (Ericsson et al. 1994). Die ME hingegen ist wichtig für die Abgabe von CRH an die Hypophyse und somit ein möglicher Angriffspunkt für zirkulierende Zytokine wie z. B. IL-6 (Lyson und McCann 1992). Auch die AP ist wichtig für die HPA-Achsen-Aktivierung. So führen Läsionen der AP zu einer deutlich verminderten Aktivierung der HPA-Achse nach verschiedenen Stimuli (Edmonds und Edwards 1996; Lee et al. 1998). Als wichtiges Zytokin für die CRH-Freisetzung wurde IL-1 β identifiziert (Gwosdow et al. 1990). Da im PVN jedoch kaum IL-1-Rezeptoren vorhanden sind (Ericsson et al. 1995; French et al. 1999), wurde schließlich bewiesen, dass die HPA-Achsen-Aktivierung durch IL-1 β indirekt über die Bildung sekundärer Mediatoren wie z. B. NO und PGE2 erfolgt (Watanabe et al. 1990; Hsieh et al. 2010). Auch TNF α und IL-6 sind potente Aktivatoren der HPA-Achse (Fukata et al. 1989; Sharp et al. 1989).

4.3 Funktion

Im basalen Zustand ist die HPA-Achse an der Regulation circadianer Rhythmen beteiligt. So sind Glucocorticoide die wichtigsten Mediatoren für circadiane Rhythmen. Zu Beginn der aktiven Phase (morgens beim Menschen, abends bei der Maus) werden im Blut die höchsten Glucocorticoid-Spiegel gefunden, zu Beginn der Ruhephase die niedrigsten (Wust et al. 2000).

Nach Aktivierung der HPA-Achse vermittelt sie verschiedene Reaktionen des Körpers, die dazu dienen den auslösenden Stressor zu beseitigen („fight or flight“), z. B. eine Erhöhung von Blutdruck und Herzfrequenz (Laborit 1976; Udelsman und Holbrook 1994). Glucocorticoide wirken außerdem anti-inflammatorisch und reduzieren die IL-1 β -, IL-6- und TNF α -Plasmalevel während sie gleichzeitig IL-10 induzieren (Waage et al. 1990; Goujon et al. 1995; Marchant et al. 1996; van der Poll et al. 1996). Die HPA-Achse wirkt also modulierend auf das Entzündungsgeschehen. Eine chronische Aktivierung der Stress-Achse hingegen, kann zu einer dauerhaften Aktivierung dieser Mechanismen und damit zu Erschöpfung und dauerhaften Schäden führen (Selye 1955).

4.4 Regulation

Die HPA-Achse ist durch verschiedene Mechanismen reguliert. In einer negativen Feedback-Reaktion hemmt z. B. Corticosteron die Freisetzung von CRH und ACTH (Sayers und Portanova 1974; Weiser et al. 2011), wodurch eine übermäßige Aktivierung der HPA-Achse verhindert wird. Auch NO, das ebenfalls als Aktivator der HPA-Achse bekannt ist, kann die CRH-Freisetzung im PVN hemmen, wirkt also ebenso modulierend (Turnbull et al. 1998).

Inflammatorische Zytokine können sowohl den PVN (siehe Kapitel 4.2) als auch direkt die Hypophyse aktivieren. Insbesondere IL-1 β und IL-6 sind dabei wichtige Aktivatoren der Hypophyse. In CRH-Knockout-Mäusen z. B. kann die HPA-Achsen-Aktivierung nach inflammatorischen Stimuli aufrecht erhalten werden, nicht jedoch in CRH- und IL-6-Knockout-Mäusen (Bethin et al. 2000), IL-6 spielt also eine wichtige Rolle in der Aktivierung der Hypophyse. IL-1 β hingegen kann die Hypophyse zur

Expression weiterer Zytokine, z. B. IL-6 stimulieren (Spangelo et al. 1991), wodurch die Aktivierung der HPA-Achse weiter verstärkt werden kann. CRH führt zusätzlich zu einer erhöhten Expression von IL-1-Rezeptoren in der Hypophyse, wodurch diese für IL-1 β sensibilisiert wird (Pournajafi Nazarloo et al. 2003). Ein weiterer Aktivator der HPA-Achse ist das „pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide“ (PACAP). Dieses kann ebenfalls sowohl die CRH-Freisetzung im Hypothalamus (Kageyama et al. 2007) als auch die Hypophyse stimulieren (Hart et al. 1992; Boutillier et al. 1994). Kürzlich wurde außerdem auch eine mögliche Beteiligung von NF-IL6 an der HPA-Achsen-Aktivierung bzw. deren Modulation vermutet (Fuchs et al. 2013). Die Regulation der HPA-Achse ist also ein komplexes System, das auch eine große Rolle bei der „sickness response“ spielt.

5. Serotonin-System

5.1 Tryptophan-Metabolismus unter physiologischen Bedingungen

Die Metabolisierung von Tryptophan unter normalen physiologischen Bedingungen erfolgt hauptsächlich in der Leber und in den enterochromaffinen Zellen des Magen-Darm-Trakts. Nur 10 bis 20 % der Metabolisierung erfolgen im Gehirn. Etwa 1 % des Tryptophans wird über die Tryptophan-Hydroxylase (TPH) zu 5-Hydroxy-Tryptophan und anschließend durch die 5-Hydroxy-Tryptophan-Decarboxylase zu Serotonin abgebaut. Die TPH hat 2 verschiedene Formen: TPH1 kommt in der Peripherie vor, während TPH2 im Gehirn zu finden ist. Das übrige Tryptophan wird durch die Tryptophan-2,3-Dioxygenase (TDO) oder in geringen Mengen durch die Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) zu Kynurenin umgebaut. Dieses kann anschließend entweder durch die Kynurenin-Acetyltransferase zu Kynureninsäure oder durch die Kynurenin-Monooxygenase (KMO) zu 3-Hydroxy-Kynurenin abgebaut werden (Myint 2012). Welcher dieser beiden Wege eingeschlagen wird, ist gewebspezifisch. Astrozyten z. B. produzieren eher Kynureninsäure (Guillemin et al. 2001), während Mikroglia und Makrophagen 3-Hydroxy-Kynurenin produzieren (Guillemin et al. 2005). 3-Hydroxy-Kynurenin wird in weiteren Schritten dann durch die Kynureninase zu 3-Hydroxy-Anthranilinsäure und schließlich zu Quinolonsäure abgebaut.

Sowohl Tryptophan als auch Kynurenin können durch spezifische Transporter ins Gehirn gelangen und dort metabolisiert werden (Pardridge und Oldendorf 1975; Fukui et al. 1991). Serotonin wirkt im Gehirn als Neurotransmitter und Neuromodulator. Dazu wird es von Neuronen in den synaptischen Spalt abgegeben und kann dort über verschiedene Serotonin-Rezeptoren wirken. Serotonin-Transporter in der präsynaptischen Membran sorgen anschließend dafür, dass das Serotonin wieder aufgenommen und metabolisiert oder recycelt wird (Jorgensen et al. 2014). Die Wirkungen von Serotonin im Gehirn sind sehr vielfältig. Es gilt als „Glückshormon“ und beeinflusst unter anderem Schlaf (Solarewicz et al. 2014), Thermoregulation (Myers 1981), Schmerzempfinden (Giordano und Rogers 1989), Verhalten (Ciobica et al. 2010) und Appetit (Kanarek und Dushkin 1988). 3-Hydroxy-Kynurenin hingegen kann depressives Verhalten fördern (Myint 2012) und durch Bildung von Radikalen neurotoxisch wirken (Okuda et al. 1998), während Kynureninsäure eher neuroprotektiv wirkt (Klein et al. 2013). Ein weiterer Metabolit, Quinolonsäure, kann z. B. über den NMDA-Rezeptor ebenfalls Depressionen auslösen (Steiner et al. 2011).

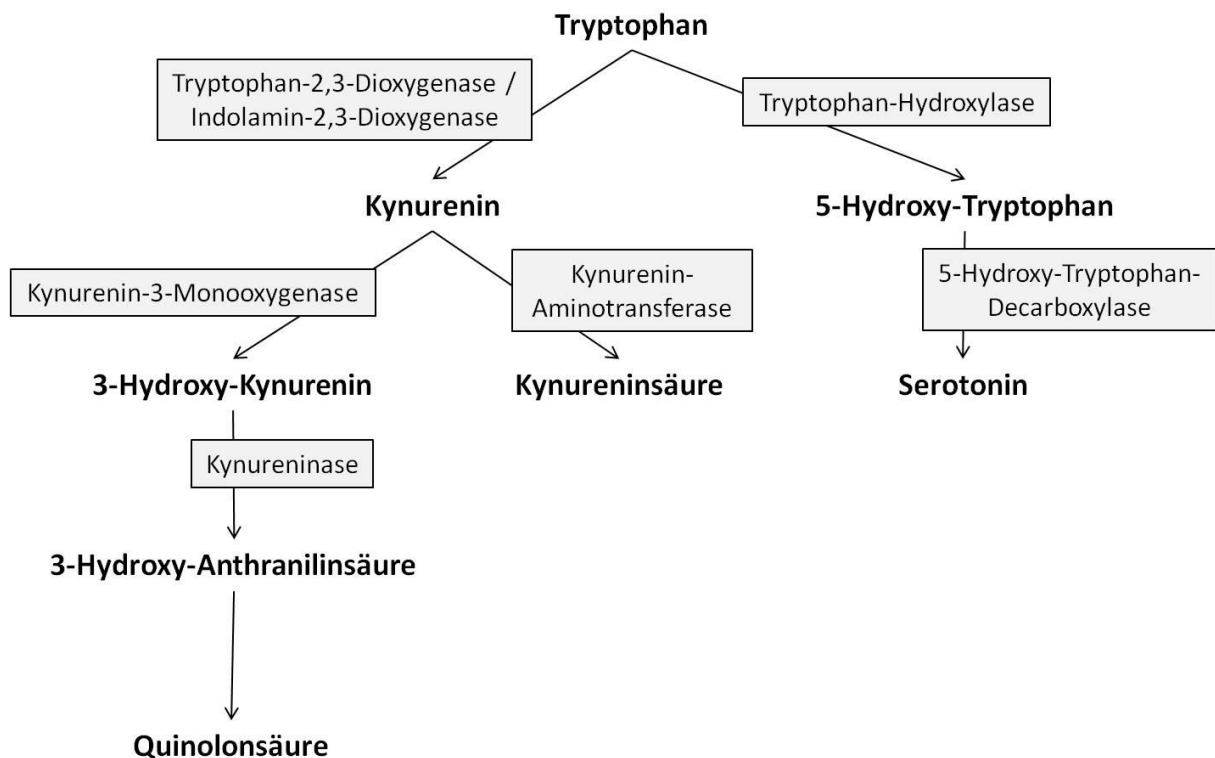


Abbildung I-9

Tryptophan-Metabolismus unter physiologischen Bedingungen. Tryptophan kann entweder durch die Tryptophan-Hydroxylase und die 5-Hydroxy-Tryptophan-Decarboxylase zu Serotonin abgebaut werden oder durch die Tryptophan-2,3-Dioxygenase bzw. die Indolamin-2,3-Deoxygenase zu Kynurenin. Dieses wiederum kann zu Kynureninsäure oder über 3-Hydroxy-Kynurenin und 3-Hydroxy-Anthranilinsäure zu Quinolonsäure abgebaut werden.

5.2 Tryptophan-Metabolismus bei Inflammation

Inflammatorische Zytokine induzieren die Expression der IDO (Jung et al. 2007). Da in der Leber hauptsächlich die TDO, die IDO jedoch eher in anderen Geweben vorkommt, wird der Tryptophan-Metabolismus dadurch vermehrt in andere Organe, z. B. das Gehirn, verlagert (Moffett et al. 1998). Durch die Induktion der IDO wird vermehrt Tryptophan zu Kynurenin abgebaut, so dass weniger Tryptophan für die Serotonin-Synthese zur Verfügung steht (Widner et al. 2002). Zusätzlich kann die TPH durch Stress gehemmt werden, wodurch die Serotonin-Synthese weiter vermindert wird (Clark et al. 2008). IDO kann außer Tryptophan auch Serotonin abbauen, so dass die Induktion der IDO auch zu einem vermehrten Abbau von Serotonin führt (Shimizu et al. 1978). Verminderte Serotonin-Spiegel gehen oft mit Depressionen einher. Somit ist dieser Vorgang eine Erklärung für depressives Verhalten im Rahmen der „sickness response“.

Inflammatorische Zytokine können außerdem die Expression der KMO induzieren (Zunszain et al. 2012). Dadurch wird Kynurenin vermehrt zum neurotoxischen 3-Hydroxy-Kynurenin und weniger zur neuroprotektiven Kynureninsäure abgebaut. Die Induktion der KMO kann also zur Neurotoxizität inflammatorischer Prozesse beitragen.

Durch den erhöhten Metabolismus von Tryptophan steht außerdem insgesamt weniger Tryptophan zur Verfügung. Dieses ist für die Proliferation und Aktivität von T-Zellen wichtig. Zusammen mit erhöhter Kynurenin-Bildung bewirkt dies eine verminderte T-Zell-Antwort (Frumento et al. 2002). Da aktivierte T-Zellen IDO exprimieren (Curreli et al. 2001), stellt die Hemmung der T-Zell-Proliferation durch die Produkte der IDO also einen negativen Feedback-Mechanismus dar.

Auch die Expression des Serotonin-Transporters wird durch inflammatorische Zytokine beeinflusst. IL-1 β z. B. kann die Expression des Transporters induzieren. Der damit verbundene vermehrte Serotonintransport in die Zellen verringert die Konzentration des wirksamen Transmitters und kann somit ebenfalls zum depressiven Verhalten bei der „sickness response“ beitragen (Zhu et al. 2010).

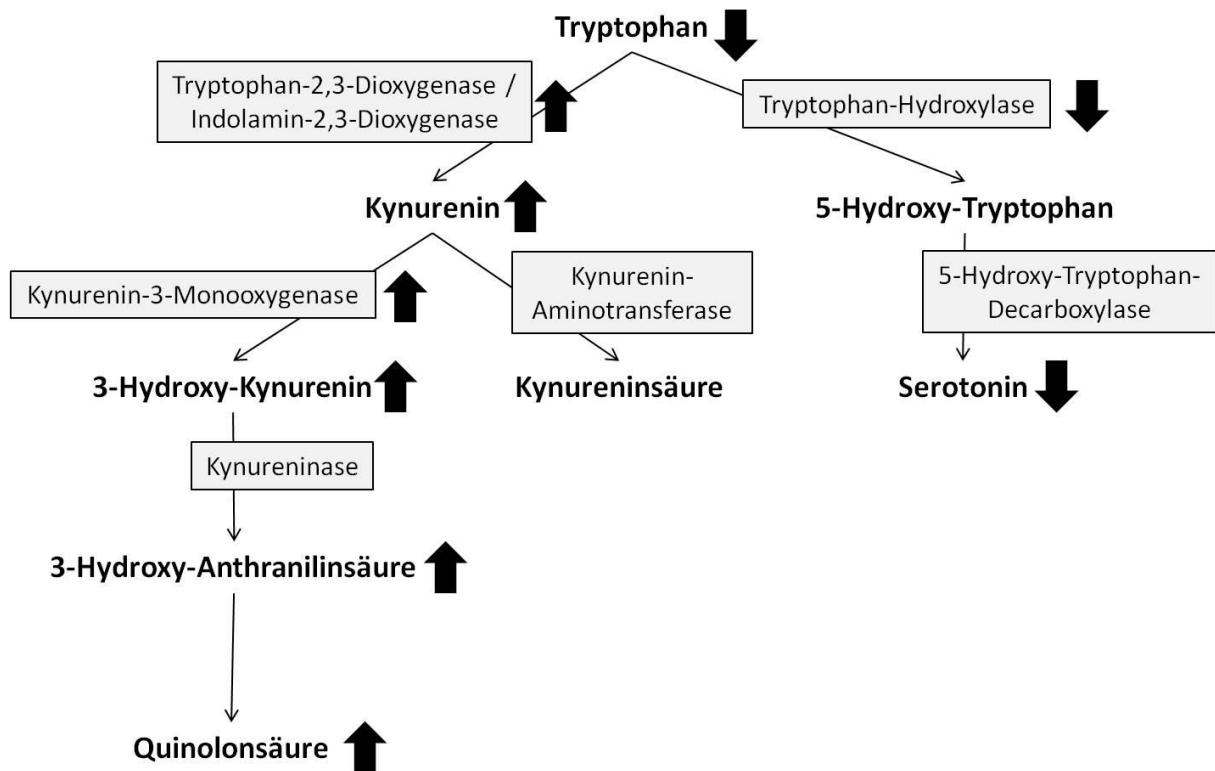


Abbildung I-10

Tryptophan-Metabolismus während inflammatorischer Prozesse. Die Indolamin-2,3-Dioxygenase sowie die Kynurenin-3-Monooxygenase werden durch inflammatorische Zytokine induziert. Dadurch wird vermehrt Kynurenin und 3-Hydroxy-Kynurenin gebildet, während Serotonin vermindert gebildet wird.

5.3 Interaktion mit der HPA-Achse

Stress und die HPA-Achse hängen eng mit dem Serotonin-System zusammen. Serotonin z. B. reguliert die Glucocorticoid-Freisetzung (Boisvert et al. 2011) sowie die Expression des Glucocorticoid-Rezeptors (Laplane et al. 2002). Die Stress-Hormone wiederum modulieren die Serotonin-Synthese und den –Abbau (De Kloet et al. 1982; Kawamura et al. 1984). Des Weiteren können Glucocorticoide die Expression der TPH2 modulieren. Diese Modulation ist tierartspezifisch

unterschiedlich. Während Mäuse auf Glucocorticoid-Gabe mit verminderter TPH2-Expression (Clark et al. 2008), auf Adrenalektomie mit erhöhter TPH2-Expression reagieren (Heydendael und Jacobson 2009), zeigen Ratten die genau umgekehrte Reaktion (Malek et al. 2007).

5.4 Depressive Störungen

Depressive Störungen sind die häufigsten psychischen Erkrankungen in Deutschland. Risikofaktoren für die Entstehung von Depressionen sind chronische Entzündungsprozesse, bei denen dauerhaft erhöhte Zytokin-Spiegel zu einer Induktion derIDO und der KMO und daher zu verminderten Serotonin- und zu erhöhten Kynurenin- bzw. Kynurenin-Metabolit-Spiegeln führen. Solche chronischen Entzündungsprozesse können bei chronischen Erkrankungen oder auch bei Übergewicht auftreten (Andre et al. 2014). Ein weiterer Risikofaktor ist genetisch bedingt. Durch einen Polymorphismus des Promotors des Serotonin-Wiederaufnahmetransporters kann dessen Expression verändert sein, wodurch ebenfalls das Risiko für Depressionen erhöht wird (Jonassen und Landro 2014).

Therapieansätze bei depressiven Störungen sind daher die Hemmung des NMDA-Rezeptors, um die Wirkung der Quinolonsäure zu vermindern (Pochwat et al. 2014), Hemmung des Serotonin-Wiederaufnahmetransporters durch selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer, wodurch das Serotonin länger im synaptischen Spalt verbleibt (Saletu et al. 1977) sowie die Hemmung des Serotonin-Abbaus durch Hemmung des Enzyms Monoaminoxidase (Johnson 1975).

Obwohl bereits einige Mechanismen der Entstehung von Depressionen geklärt sind und auch einige Therapiemöglichkeiten bestehen, sind aufgrund der hohen Prävalenz der depressiven Störungen weitere Klärung der Mechanismen und weitere Therapieoptionen von hohem Interesse.

6. Versuchsmodelle

6.1 LPS-induzierte Entzündungsreaktion

Lipopolysaccharid besteht aus drei verschiedenen Molekülanteilen: Einem Polysaccharid-Teil, der als O-Antigen fungiert, einer Kernregion als Verbindung und einem Lipid-A-Teil, der als Endotoxin und als eigentliches PAMP dient (Rietschel et al. 1994; Holst et al. 1996). Es kommt in den Zellwänden gram-negativer Bakterien vor. In dieser Studie wurde LPS, das aus *Escherischia coli* des Serotyps O111:B4 gewonnen und aufgereinigt wurde, verwendet und systemisch appliziert. Im Blut bindet LPS an das LPS-Bindungsprotein und dieses dann an löslichen oder Membran-gebundenen CD14 (Wright et al. 1990). Dieser Komplex kann dann im Folgenden den TLR4 aktivieren (Chow et al. 1999) und so eine Signalkaskade auslösen (siehe auch Kapitel 2.1.4.1). Auf diese Weise wird je nach Umgebungstemperatur eine stereotype, reproduzierbare, generalisierte Inflammation und Fieberantwort ausgelöst (Kozak et al. 1994). In dieser Studie wurden zwei verschiedene Dosierungen von LPS verwendet. Die niedrige Dosis (50 µg/kg) löst in Mäusen normalerweise eine Fieberreaktion über ca. 7 h aus (Fuchs 2013), die hohe Dosis (2,5 mg/kg) über ca. 45 h (Kozak et al. 1994).

6.2 Induktion der Neutropenie

Neutropenie wurde in den Mäusen durch Applikation eines spezifischen Antikörpers gegen polymorph-nukleäre Leukozyten (PMN) hervorgerufen. Der Antikörper wurde in einer Dosierung von 2 mg/kg 24 h vor und gleichzeitig mit der Injektion von LPS bzw. PBS verabreicht. Diese Behandlung reduziert die Anzahl der zirkulierenden neutrophilen Granulozyten um über 90%, während die Anzahl anderer Leukozytenarten nicht beeinflusst wird (McColl et al. 2007). Auch die Zahl der neutrophilen Granulozyten, die nach LPS-Stimulation ins Gehirn einwandern, wird so deutlich reduziert (Aguilar-Valles et al. 2014).

7. Zielsetzung der Arbeit

NF-IL6 wurde bereits mit verschiedenen Krankheitsbildern in Zusammenhang gebracht. Es spielt z. B. eine Rolle bei ischämischen Hirnschäden, amyotroper Lateralsklerose sowie Alzheimer. Auch eine Rolle für Tumor-Proliferation

und -Metastasierung wurde bereits beschrieben (siehe auch Kapitel 3.2). Des Weiteren wurde bei SIV („simian immunodeficiency virus“)-Infektionen ein Zusammenhang der kurzen NF-IL6-Isoform LIP mit der IFN β -vermittelten Suppression des SIV beschrieben (Ravimohan et al. 2010). Dies legt, zusammen mit der Erkenntnis, dass NF-IL6 und NF κ B an der Replikation der RNA des HIV beteiligt sind (Ruocco et al. 1996), auch eine Beteiligung von NF-IL6 bei HIV-Infektionen nahe. Über die Beteiligung an der Bildung von IL-6 ist NF-IL6 auch an chronischen inflammatorischen Prozessen beteiligt. So findet man z. B. bei Übergewicht und im Alter chronische inflammatorische Zustände, die mit einer erhöhten hypothalamischen NF-IL6-Expression einhergehen (Koenig et al. 2014; Maric et al. 2014). Viele dieser Krankheiten sind bisher nicht oder nur unzureichend therapierbar. Eine genaue Kenntnis der zugrunde liegenden Mechanismen der Beteiligung von NF-IL6 an inflammatorischen Prozessen und der Kommunikation zwischen Peripherie und Gehirn ist also von großem Interesse.

Während systemischer Entzündungen wird NF-IL6 erst spät aktiviert, deshalb wird vermutet, dass es an der Aufrechterhaltung oder der Beendigung der Fieberantwort beteiligt sein könnte (Damm et al. 2011). Auch Hinweise auf eine Rolle von NF-IL6 für die Aktivierung der Stress-Achse wurden bereits beschrieben (Fuchs et al. 2013). Die genaue Rolle von NF-IL6 für die Entstehung der „sickness response“ und für die verschiedenen Kommunikationswege zwischen Immunsystem und Gehirn ist jedoch weiterhin nicht geklärt.

Zur genaueren Charakterisierung der Rolle von NF-IL6 sollen in dieser Arbeit also folgende Fragestellungen untersucht werden:

- Physiologische Parameter von NF-IL6-Knockout-Mäusen sowie Wildtyp-Mäusen unter basalen Bedingungen, bei „novel environment stress“ und bei LPS-induzierter systemischer Entzündung
 - o Welchen Einfluss hat die NF-IL6-Defizienz auf die Entstehung der „sickness response“ insbesondere Fieber und Lethargie?

- Beeinflusst NF-IL6 die Reaktion der Mäuse auf „novel environment stress“?
- Charakterisierung der Bedeutung von NF-IL6 für den humoralen Kommunikationsweg zum Gehirn
 - Beeinflusst NF-IL6 periphere inflammatorische Mediatoren?
 - Wie beeinflusst NF-IL6-Defizienz die Expression inflammatorischer Mediatoren, Transkriptionsfaktoren und Zielgene im Gehirn?
- Beeinflussung des zellulären Kommunikationswegs zum Gehirn durch NF-IL6
 - Beeinflusst NF-IL6 die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten zum Gehirn während systemischer Entzündungen?
 - Werden perivaskuläre Makrophagen durch NF-IL6 beeinflusst?
 - Da neutrophile Granulozyten NF-IL6-Aktivierung zeigen: wie beeinflusst Neutropenie die Kommunikation zwischen Peripherie und ZNS sowie die Expression inflammatorischer Mediatoren, Transkriptionsfaktoren und Zielgene im ZNS?
- Veränderungen der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse in NF-IL6-Knockout-Mäusen
 - Beeinflusst NF-IL6 die HPA-Achse und wenn ja, auf welchen Stufen wird sie durch NF-IL6 reguliert?
- Veränderungen des Serotonin-Systems in NF-IL6-Knockout-Mäusen
 - Hat NF-IL6 einen Einfluss auf den Tryptophan-Metabolismus und auf die Entstehung LPS-induzierter Depressionen?

II. Material und Methoden

1. Allgemeine Materialien

1.1 Technische Geräte

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Aqua bidest. Anlage	Milli-Q Biocel	Millipore GmbH, Schwalbach
Autoklav	Systec 2540 EL	Systec GmbH Labor-Systemtechnik, Wettenberg
Eismaschine	Icematic F120	CastelMAC S.p.A., Castelfranco Veneto, Italien
Heißluftsterilisator	ED 115 / E2	Binder GmbH, Tuttlingen
Kühlkammer	EP200ED	Viessmann, Allendorf
Lamina-Flow-Arbeitsbank	Herasafe	Kendo Laboratory Product GmbH, Hanau
Magnetrührer	PTFE-ummantelt	Roth GmbH, Karlsruhe
Microcentrifuge	Force 7	Denver Instrument Company, Bohemia, NY, USA
pH-Meter	inoLab pH 7110	WTW GmbH, Weilheim
Schüttler	RotoMix Typ 50800	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Spectrafuge Mini-Centrifuge	C1301B-230V	Labnet International Inc., Edison, NJ, USA
Tischrühr- und Heizgerät	RCT basic	IKA Labortechnik GmbH und Co. KG, Staufen
Vortexer	MS1 Minishaker	IKA-Werke GmbH und Co. KG, Staufen
Waage (Chemikalien)	AE163	Mettler Waagen GmbH, Gießen
Waage (Chemikalien)	P1210N	Mettler Waagen GmbH, Gießen
Waage (Chemikalien)	PM2500	Mettler Waagen GmbH, Gießen
Wärmeschrank	T5050 EK	Medizin- und Labortechnik H. Kretschmer, Gießen
Zentrifuge	Megafuge 1.0 R	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich

1.2 Software

Bezeichnung	Hersteller
Adobe Photoshop 6.0	Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA

CorelDraw 9	Corel Corporation, Ottawa, Canada
EndNote X5	Adept Scientific GmbH, Frankfurt
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, San Diego, CA, USA
Microsoft Excel 2007	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Microsoft Word 2007	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Statistica 10	Stat Soft Europe GmbH, Hamburg

1.3 Chemikalien

Bezeichnung	Katalog-Nummer	Hersteller
Alkohol (reinst)	34852-1L	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Alkohol (vergällt)	1611V	Berkel AHK Alkoholhandel GmbH und Co. KG, Ludwigshafen
Trockeneis		Cleanas GmbH und Co. KG, Willingen
Virkon	128054	Antec International, Sudbury, UK

1.4 Ge- und Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Alufolie	0954.1	Roth GmbH, Karlsruhe
Bechergläser	Duran, verschiedene Größen	Schott AG, Mainz
Dualfilter T.I.P.S.	0,1-10 / 0,5-20 / 2-100 / 50-1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Einmalhandschuhe Latex	No. 1202	Unigloves Arzt- und Kliniksbedarf Handelsgesellschaft mbH, Troisdorf
Einmalhandschuhe Nitril	7005 PFS	Showa Best Gloves S.A.S., Paris, Frankreich
Einmalhandschuhe Supergrip	900-2536	Henry Schein Vet GmbH, Hamburg
Falcon Tubes	15 / 35 ml	Sarstedt AG und Co. KG, Nümbrecht
Glasflaschen mit Deckel	Duran, verschiedene Größen	Schott AG, Mainz
Kimtech Science Delicate Task Wipes	7216	Kimberly-Clark Europe Limited, Surrey, UK
Kimtech Science Precision Wipes	7552	Kimberly-Clark Europe Limited, Surrey, UK
Messkolben	1 / 2 / 5 l	Brand GmbH und Co. KG, Wertheim

Parafilm	PM-996	Bemis Flexible Packaging, Neenah, WI, USA
Pasteur-Pipetten	2600111	MAGV GmbH, Rabenau
Pipettenspitzen ohne Filter	10 / 100 / 1000 µl	Sarstedt AG und Co. KG, Nümbrecht
Reaktionsgefäßständer	/	Roth GmbH, Karlsruhe
Serologische Pipetten	5 / 10 / 25 ml	Sarstedt AG und Co. KG, Nümbrecht
Tubes	0,5 / 1,5 / 2 ml	MAGV GmbH, Rabenau

2. In vivo Versuche

2.1 Materialien

2.1.1 Technische Geräte

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Blockthermostat	BT100	Kleinfeld Labortechnik GmbH, Gehrden
Dataport	DP-24	Mini Mitter Co. Inc., Bend, OR, USA
Dietscan Analyzer	/	Accuscan Instruments Inc., Columbus, OH, USA
Elektrophorese-Apparatur	PowerPac 200	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
Elektrophorese-Kammer	G45/1	Biometra, Göttingen
Klimagerät (Stall)	RC-E3	Mitsubishi, Minato, Japan
Klimakammer	10'US /+5 to +40 DU	Weiss Umwelttechnik GmbH, Reiskirchen
Mikrowelle	/	Technostar
Molecular Imager	Chemidoc TM XRS	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
Perfusor	/	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Schermaschine	Favorita II GT 104	Aesculap, Tuttlingen
Telemetrie-Empfängerplatten	RTA-500	Mini Mitter Co. Inc., Bend, OR, USA
Telemetrie-Sender	VM-FH TR-3000	Mini Mitter Co. Inc., Bend, OR, USA
Thermocycler	Mastercycler gradient	Eppendorf AG, Hamburg
Waage (Futter)	EK-200i	A&D Instruments Ltd., Abingdon, UK
Waage (Tiere)	TB31000P-000D002	Sartorius GmbH, Göttingen
Waage (Wasser)	EW-300G	A&D Instruments Ltd., Abingdon, UK
Wärmematte	/	MarMed GmbH, Cölbe

Wärmematte	Thermofol-Wärmefolie	Thermo Flächenheizungs GmbH, Rohrbach
------------	----------------------	---------------------------------------

2.1.2 Software

Bezeichnung	Hersteller
Accudiet 1.20	Accuscan Instruments Inc., Columbus, OH, USA
Quantity One 4.6.9	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
VitalView 3.1	Mini Mitter Co. Inc., Bend, OR, USA

2.1.3 Chemikalien

Bezeichnung	Katalog-Nummer	Hersteller
Agarose	15510-019	Life technologies, Carlsbad, CA, USA
Borsäure	B-0252	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DNeasy Blood & Tissue Kit (50)	69504	Qiagen GmbH – Germany, Hilden
EDTA	E-1644	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethidiumbromid	E1510-10ML	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Korsolex AF	UN3267	Bode Chemie, Hamburg
Lipopolysaccharid aus E. coli O111:B4	L2630 Lot: 030 M 4114	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
peqGOLD Tissue DNA Mini Kit (S-line)	12-3396-01	PEQLAB Biotechnologies GmbH, Erlangen
phosphate buffered saline (PBS)	L1825	Biochrom GmbH, Berlin
Ready-Load 100bp DNA-Ladder	10380-012	Life technologies, Carlsbad, CA, USA
RedTaq	R2648-20RXN	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tissue Freezing Medium	020108926	Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch
Trizma-Base	T-1503	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

2.1.4 Ge- und Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Typ	Hersteller
0,2 ml 8er PCR-Gefäß farblos	781320	Brand GmbH und Co. KG, Wertheim
8er PCR-Deckel farblos gewölbt	781340	Brand GmbH und Co. KG, Wertheim
Applikator für Ohrmarken	No. 24220-00	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg

Material und Methoden

Batterie für Sender	319 SR527 SW	Renata SA, Itingen, Schweiz
Einmal-Spritzen	1 ml / 60 ml	BD Plastipak, Heidelberg
Einstreu	H1505-29	Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest
Filtertop	/	Ehret Labor- und Pharmatechnik, Emmerdingen
Futter	Extrudat / Mehl V1126	Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest
Futterbox (Klimakammer)	/	Campuswerkstatt FB10, JLU Gießen
Gelgießform	/	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
Häuschen / Röhren	/	Ehret Labor- und Pharmatechnik, Emmerdingen
Käfig (Klimakammer)	/	Campuswerkstatt FB10, JLU Gießen
Kanülen	26 G x ½“	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Leukosilk	01022-00	BSN-medical GmbH, Hamburg
Nestlets	/	Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest
Nicht-resorbierbares Nahtmaterial	7201519, Polyester	SMI AG, St. Vith, Belgien
Ohrclip	517 684 805	B.Y.T. & Co., Bay City, MI, USA
Ohrmarken	No. 24220-50	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
OP-Besteck	/	Aesculap, Tuttlingen
Petrischale	83.1802	Sarstedt AG und Co. KG, Nümbrecht
Polycarbonat-Käfige	Typ III	Ehret Labor- und Pharmatechnik, Emmerdingen
Resorbierbares Nahtmaterial	11201519, PGA	SMI AG, St. Vith, Belgien
Schale mit Gitter	/	Campuswerkstatt FB10, JLU Gießen
Skalpellschneide	900-8946	Henry Schein Vet GmbH, Hamburg
Tunnel zur Futterbox	/	Campuswerkstatt FB10, JLU Gießen
Tupfer	Schlinggazetupfer	Wilh. Weisweiler GmbH und Co. KG, Münster
Wachs	Elvax Coating	DuPont, Wilmington, DE, USA
Wasserflasche mit Tränkenippel	/	Ehret Labor- und Pharmatechnik, Emmerdingen
Wasserflasche mit Tränkenippel (Klimakammer)	/	Ehret Labor- und Pharmatechnik, Emmerdingen
Zellstoff	/	MAGV GmbH, Rabenau

Zylinder zum Wiegen der Tiere	/	Campuswerkstatt FB10, JLU Gießen
-------------------------------	---	----------------------------------

2.1.5 Medikamente

Handelsname	Wirkstoff	Hersteller
Braunol	Povidon-Iod	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Cutasept	Propan-2-ol	Bode Chemie, Hamburg
Heparin-Natrium-25000-ratiopharm	Heparin-Natrium	Ratiopharm GmbH, Ulm
Ketamin 10%	Ketamin	Medistar Arzneimittelvertrieb GmbH, Scheberg
Metacam oral 1,5 mg/ml	Meloxicam	Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim
NaCl 0,9%	NaCl	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Narcoren	Pentobarbital-Natrium	Merial, Halbermoos
Silberspray	Aluminium-Microionisat	Heiland Med GmbH und Co. KG, Hamburg
Thilo-Tears Gel	/	Alcon Pharma GmbH, Freiburg
Xylavet	Xylazin	Cp-pharma, Burgdorf

2.2 Versuchstiere

2.2.1 Maus-Stämme

2.2.1.1 NF-IL6-Knockout-Mäuse

Für die *in vivo* Versuche wurden NF-IL6-Knockout-Mäuse (KO) verwendet (Screpanti et al. 1995). Bei diesem Maus-Stamm wurden mittels „Gene-Targeting“ die carboxy-terminalen 72 Aminosäuren des NF-IL6-Proteins, der Leuzin-Zipper und Teile der basischen Domäne, durch eine MCI-neo poly(A) + Kassetten ersetzt. Dieses Konstrukt wurde anschließend in embryonale Stammzellen der Linie 129S/SvEv-Gpi1^c transferiert, welche dann in C57BL/6 Blastozysten mikroinjiziert wurden. Die daraus resultierenden männlichen Chimären wurden anschließend mit weiblichen MF1-Mäusen verpaart um heterozygote Nachkommen zu erhalten. Mit diesen konnten dann homozygote Mäuse gezüchtet werden. Der genetische Hintergrund der KO beruht also auf drei verschiedenen Maus-Stämmen: C57BL/6, 129S und MF1. Zum Aufbau der

institutseigenen Zucht (s. u.) wurden heterozygote Mäuse (vier weibliche und zwei männliche) von The Jackson Laboratory, Maine, USA bezogen (<http://jaxmice.jax.org/strain/006873.html>).

2.2.1.2 CD1-Mäuse

Als Sentinel-Tiere zur Kontrolle des Gesundheitsstatus der Tiere im Stall wurden CD1-Mäuse verwendet. Zum Aufbau der institutseigenen Zucht wurden je zwei männliche und weibliche CD1-Mäuse von Charles River, Sulzfeld bezogen (<http://www.criver.com>).

2.2.2 Haltung

Die Mäuse wurden in Kleingruppen in transparenten Polycarbonat-Käfigen Typ III mit Filtertop gehalten. Diese wurden mit Einstreu sowie Nestlets und roten Häuschen oder Röhren als „environmental enrichment“ ausgestattet (siehe Abbildung II-1). Pelletiertes Zuchtfutter und Wasser standen den Mäusen *ad libitum* zur Verfügung. Die relative Luftfeuchtigkeit lag bei 50 ± 5 %, die Umgebungstemperatur bei 25 ± 1 °C. Außerdem wurde ein künstliches Beleuchtungsprogramm mit 12 h Licht (von 07:00 bis 19:00 Uhr) verwendet.



Abbildung II-1

Wildtyp-Maus in einem Käfig mit „environmental enrichment“: Eine rote Plastikröhre als Versteck sowie Nestlets als Nestbau-Material.

2.2.3 Zucht der NF-IL6-Knockout-Mäuse

Die Zucht sowie die Genotypisierung der NF-IL6-Knockout-Mäuse am Institut wurde ursprünglich durch Franziska Fuchs (Fuchs 2013) etabliert und anschließend von mir fortgeführt.

Im Januar 2010 wurden vier weibliche und zwei männliche, vier bis sechs Wochen alte heterozygote Elterntiere vom Jackson Laboratory gekauft. Nach einer Eingewöhnungsphase im institutseigenen Stall wurde mit der Zucht begonnen. Dazu wurden immer zwei heterozygote Weibchen mit einem heterozygoten Männchen zusammengesetzt. Dieses „Mating Trio“ sollte eine möglichst effiziente Zucht sowie gegenseitige Hilfe der weiblichen Tiere bei der Aufzucht der Nachkommen gewährleisten. Nach einer Tragzeit von 18 bis 21 Tagen kamen zwei bis acht Jungtiere zur Welt. Kurz vor der Geburt wurden die männlichen Tiere aus dem Käfig entfernt und mit anderen weiblichen Tieren zusammengesetzt, da die männlichen Tiere in diesem Maus-Stamm den Aufzucht-Erfolg negativ beeinflussen. Die Nachkommen wurden nach drei bis vier Wochen abgesetzt und nach Geschlechtern getrennt in neue Käfige verbracht. In diesem Alter wurden sie außerdem mit einer Ohrmarke eindeutig und dauerhaft markiert und es wurde eine Ohrstanze als Gewebeprobe zur Genotypisierung entnommen. Bei der Zucht mit heterozygoten Elterntieren werden bei den Nachkommen nach den Mendel'schen Gesetzen 25 % homozygote Knockout-Tiere, 50 % heterozygote Tiere und 25 % Wildtyp-Tiere erwartet (siehe Abbildung II-2).

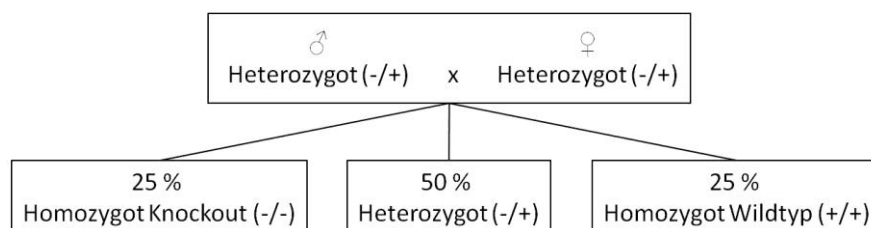


Abbildung II-2

Zucht-Schema und erwartete Verteilung der Genotypen bei den Nachkommen.

Bei der Zucht der NF-IL6-Knockout-Mäuse lag der Anteil der homozygoten Knockout-Mäuse jedoch lediglich bei ca. 12 %. Die Ursache hierfür war eine erhöhte

perinatale Sterblichkeit der homozygoten Knockout-Tiere. Diese wurde bereits von (Croniger et al. 1997) beschrieben und ist bedingt durch eine starke Hypoglycämie der neugeborenen Tiere, die aus einer Unfähigkeit zur Glycogen-Mobilisation sowie zur Gluconeogenese resultiert. Des Weiteren kommt es aufgrund einer defekten Adipogenese und Thermoregulation bereits *in utero* zu einer erhöhten Sterblichkeit (Croniger et al. 1997; Carmona et al. 2005). Auch Kannibalismus und Vernachlässigung des Nachwuchses durch die Mutter wurden beobachtet. Um dies zu minimieren, wurden in gegebenen Fällen CD1-Mäuse als Ammen eingesetzt. Dazu wurden die Nachkommen eines NF-IL6-Knockout-Zuchtpärchens mit Einstreu aus dem CD1-Käfig abgerieben und anschließend zum übrigen CD1-Wurf dazugesetzt. Dank der unterschiedlichen Fellfarbe der beiden Tierstämme (CD1-Mäuse weiß, NF-IL6-Knockout-Tiere braun) war es weiterhin möglich, die Mäuse eindeutig zu unterscheiden. Dank dieser Maßnahme konnte die neonatale Sterblichkeit der Mäuse deutlich reduziert werden. Die homozygoten Knockout-Tiere wurden im Alter von sechs bis zwölf Wochen für die *in vivo* Experimente verwendet; ebenso ihre Wildtyp-Geschwistertiere. Die heterozygoten Nachkommen wurden nach Erreichen der Geschlechtsreife (♂ 4-5 Wochen; ♀ 5-7 Wochen) in der Zucht eingesetzt.

2.2.4 Genotypisierung der NF-IL6-Knockout-Mäuse

2.2.4.1 Probengewinnung

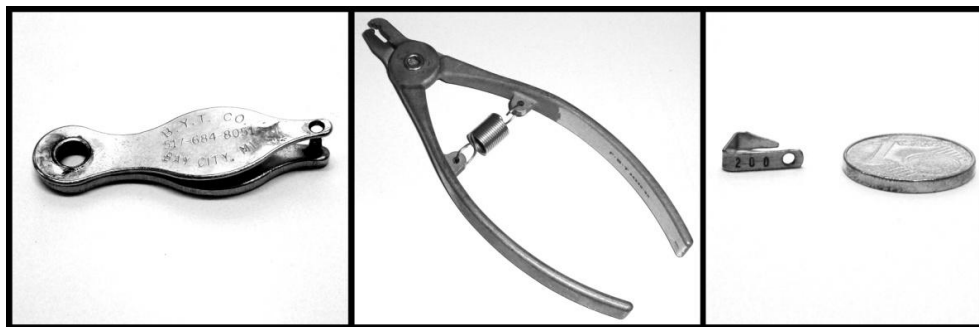


Abbildung II-3

Geräte zur Probenentnahme und Kennzeichnung der Mäuse. Links: Ohrclip; Mitte: Ohrmarken-Zange; Rechts: Ohrmarke

Im Alter von drei bis vier Wochen wurden Gewebeproben zur Genotypisierung der Jungtiere entnommen und die Tiere gleichzeitig mit einer Ohrmarke gekennzeichnet. Dazu wurde ein steriles Besteck bestehend aus zwei anatomischen Pinzetten und einem Ohrclip verwendet. Das Jungtier wurde von einer Person auf der Arbeitsplatte im Zuchtraum fixiert, während eine zweite Person mit dem Ohrclip (siehe Abbildung II-3) eine Hautstanze von 2 mm Durchmesser aus dem linken Ohr entnahm. Die Gewebeprobe wurde anschließend sofort in ein steriles, nummeriertes 1,5ml-Tube überführt. Anschließend wurde eine Ohrmarke mit Hilfe des Ohrmarken-Applikators in das rechte Ohr der Maus eingebracht. Auf die Ohrmarken war eine dreistellige, fortlaufende Nummer gelasert, so dass die Mäuse anhand ihrer Ohrmarken eindeutig identifiziert werden konnten. Nach der Beprobung jeder Maus wurde das Besteck gereinigt und mit 80%igem Ethanol desinfiziert um eine Kreuzkontamination zwischen den einzelnen Proben zu vermeiden. Falls die Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Extraktion nicht am gleichen Tag durchgeführt wurde, wurden die Proben anschließend bei -54°C gelagert. Die Probenentnahme habe ich zusammen mit PD Dr. Christoph Rummel durchgeführt.

2.2.4.2 Extraktion der DNA

Die DNA-Extraktion wurde mit zwei verschiedenen DNA-Extraktions-Kits durchgeführt: Dem PeqGold Tissue DNA Mini Kit von PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen und dem DNeasy Blood and Tissue Kit von Qiagen GmbH Germany, Hilden. Die Vergleichbarkeit beider Kits wurde getestet, indem die DNA aus Proben von Mäusen mit bekanntem Genotyp (1 x Wildtyp und 1 x Knockout) mit beiden Kits extrahiert wurde. In der anschließenden PCR und Gelelektrophorese waren keine Unterschiede zwischen den beiden Kits ersichtlich.

Beide Kits beruhen auf dem gleichen Prinzip. Zunächst wird durch Proteinase K die Gewebeprobe lysiert, RNA mittels RNase zerstört und die DNA aus dem Zellkern freigesetzt (siehe auch Tabelle II-1). Anschließend wird beim Peqlab-Kit durch Zentrifugation und Abnahme des Überstandes eventuell vorhandener, unlöslicher Debris entfernt.

Arbeitsschritt Qiagen-Kit	Arbeitsschritt Peqlab-Kit	Funktion	Dauer
180 µl Buffer ATL 20 µl Proteinase K Vortexen Inkubation (56°C) /	400 µl Lysis Buffer T 20 µl Proteinase K 15 µl RNase A, vortexen Inkubation (50°C) Zentrifugieren: 10.000 x g Überstand in neues Tube	Auflösung des Zellverbandes, Freisetzung der DNA aus dem Zellkern	2-3 h
Vortexen 200 µl Buffer AL + vortexen 200 µl Ethanol + vortexen	200 µl DNA Binding Buffer Mittels Pipette mischen	Ausfällung der DNA und Herstellung einer homogenen Mischung	/
Mischung auf Säule laden Zentrifugieren: 6.000 x g Durchfluss verwerfen	Mischung auf Säule laden Zentrifugieren: 10.000 x g Durchfluss verwerfen	Bindung der DNA an die Silikat-Membran in der Säule	1 min / 2 min
500 µl Buffer AW1 Zentrifugieren: 6.000 x g Durchfluss verwerfen	650 µl DNA Wash Buffer Zentrifugieren: 10.000 x g Durchfluss verwerfen	Entfernung von zellulärem Debris, Proteinen und sonstigen Kontaminanten	1 min
500 µl Buffer AW2 Zentrifugieren: 20.000 x g Durchfluss verwerfen	650 µl DNA Wash Buffer Zentrifugieren: 10.000 x g Durchfluss verwerfen Zentrifugieren: 10.000 x g	Entfernung von Proteinen, Debris und Kontaminanten Anschließend Trocknung der Silikat-Membran	3 min / 1 + 2 min
Säule in steriles 1,5ml Tube 200 µl Buffer AE Inkubation bei RT Zentrifugieren: 6.000 x g	Säule in steriles 1,5ml Tube 200 µl Elution Buffer Inkubation bei RT Zentrifugieren: 6.000 x g	Lösen der DNA aus der Silikat-Membran Überführung der DNA in das 1,5 ml Tube	1 min / 3 min 1 min

Tabelle II-1

Arbeitsschritte zur DNA-Extraktion mit zwei verschiedenen DNA-Extraktions-Kits.

Buffer AL und DNA Binding Buffer, die im nächsten Schritt zugegeben werden, enthalten chaotrope Salze, wodurch im folgenden Schritt – Beladen der im Kit enthaltenen Säule mit dieser Mischung – eine Bindung der DNA an die in der Säule enthaltene Silikat-Membran ermöglicht wird (siehe Abbildung II-4). Die Silikat-

Membran ist im wässrigen Milieu ebenso wie die DNA-Stränge von einer Hydrathülle umgeben, welche Wechselwirkungen zwischen der Silikat-Membran und der DNA verhindert. Chaotrope Salze jedoch ziehen die Wassermoleküle stärker an und entfernen so reversibel die Hydrathülle von der DNA und der Silikat-Membran. Dadurch fällt die DNA aus der wässrigen Lösung aus und kann stattdessen Wechselwirkungen, z. B. Wasserstoffbrückenbindungen, mit der Silikat-Membran ausbilden und so an die Silikat-Membran binden. Durch die nun folgenden Wasch-Schritte mit weiteren salzhaltigen Lösungen werden verschiedene Kontaminanten, z. B. Proteine oder Zell-Debris, entfernt, ohne dass die DNA von der Silikat-Membran gelöst wird. Im letzten Schritt wird die gereinigte DNA dann mit einem salzfreien Puffer aus der Silikat-Membran gelöst, wobei wieder eine Hydrathülle um die DNA und die Silikat-Membran gebildet wird, und in ein steriles 1,5ml-Tube geschwemmt.

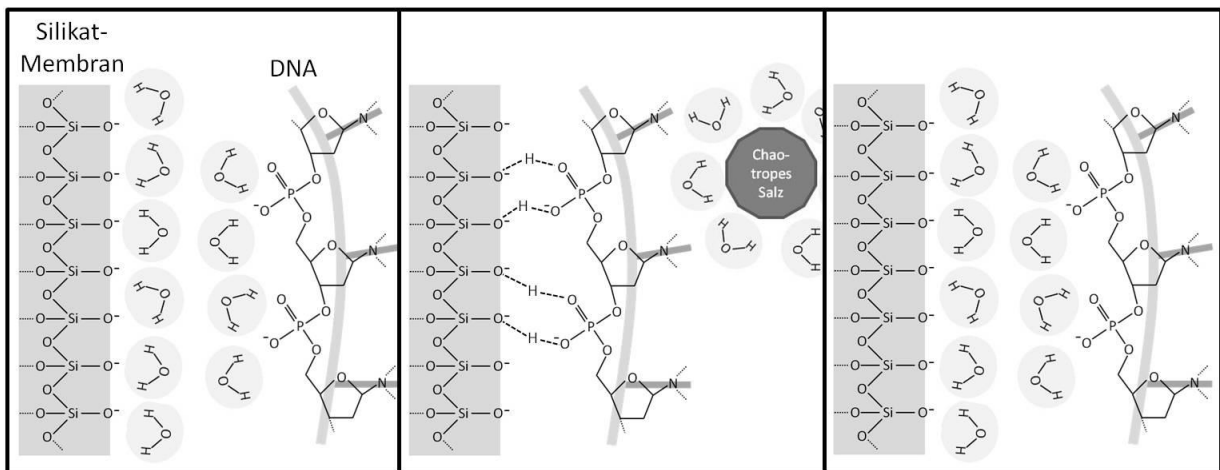


Abbildung II-4

(A) Im wässrigen Milieu sind die Silikat-Membran und die DNA von einer Hydrathülle umgeben. (B) In Anwesenheit eines chaotropen Salzes zieht dieses die Wasser-Moleküle an, so dass Wechselwirkungen zwischen der Silikat-Membran und der DNA entstehen können und die DNA an die Membran gebunden wird. (C) Spült man die Membran erneut mit einer salzfreien Lösung, löst sich die DNA von der Silikat-Membran und beide werden wieder von einer Hydrathülle umgeben. Modifiziert nach Macherey-Nagel „Nucleic Acid Purification Kit... a black box?“ Seminarunterlagen.

2.2.4.3 Amplifikation der DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction; PCR) wurde ursprünglich Anfang der 1970er Jahre von Kjell Kleppe und, nachdem diese in Vergessenheit geraten war, über 10 Jahre später erneut von Kary Mullis entwickelt (Kleppe et al. 1971; Mullis et al. 1986). Sie dient der exponentiellen Amplifikation spezifischer Sequenzen eines einzel (ss)- oder doppelsträngigen (ds) DNA-Moleküls *in vitro*. Dazu wird ein Enzym, die DNA-Polymerase, verwendet. Während Kleppe und Mullis noch eine thermolabile DNA-Polymerase verwendeten, die aus *Escherichia coli* extrahiert wurde, wird heutzutage meist eine sogenannte Taq-Polymerase benutzt. Diese ist thermostabil bis zu Temperaturen von annähernd 100°C und wird aus dem in heißen Quellen lebenden Bakterium *Thermus aquaticus* gewonnen. Um die Amplifikation einer spezifischen Sequenz der DNA zu erreichen, werden außerdem Oligonucleotid-Primer benötigt. Diese sind komplementär zu kurzen Abschnitten der Zielsequenz und dienen als Startpunkt für die DNA-Polymerase.

Die PCR besteht im Wesentlichen aus 3 Schritten: Bei der Denaturierung werden bei 94°C die beiden Stränge eines dsDNA-Moleküls (Template) getrennt. Der nächste Schritt – das „Annealing“ – findet bei 64°C statt. Hier binden die Primer spezifisch an die DNA-Stränge. In der folgenden Elongation bildet die DNA-Polymerase dann bei 72°C vom Primer ausgehend einen neuen, zum Template komplementären DNA-Strang (siehe auch Abbildung II-5). Die dazu benötigten Bausteine werden als Desoxyribonucleosidtriphosphat-Moleküle (dNTPs) dem Reaktionsgemisch zugegeben.

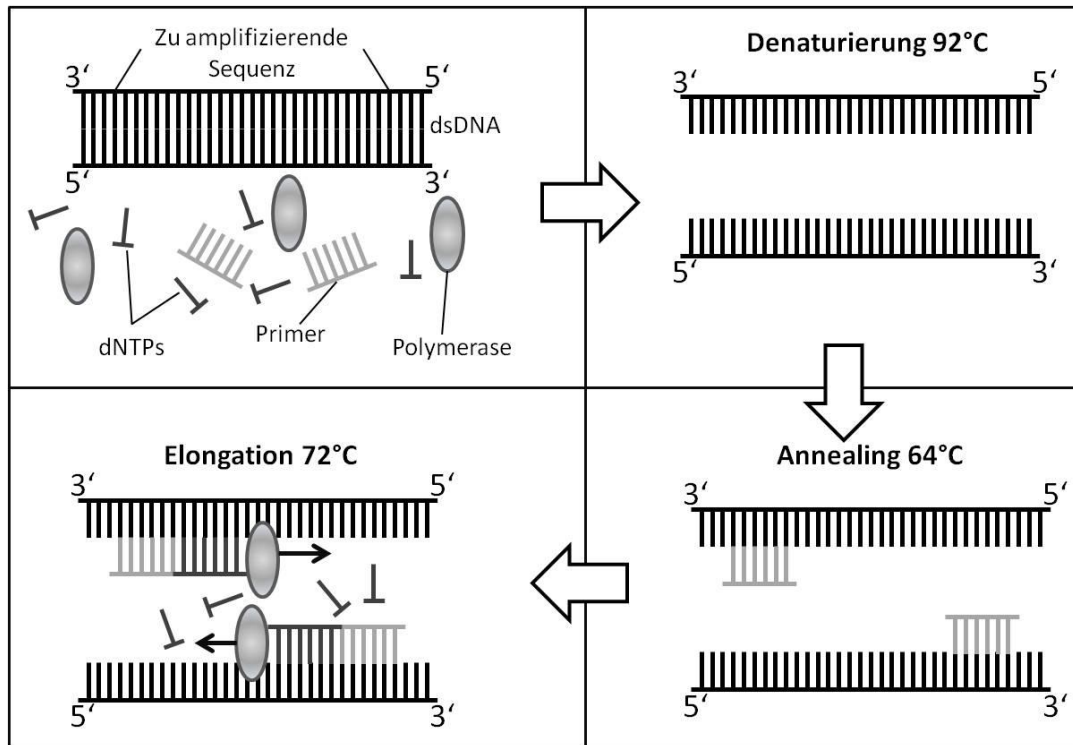


Abbildung II-5

Die drei Schritte der PCR: Denaturierung, Annealing und Elongation. dNTPs = Desoxyribonucleosidtriphosphat-Moleküle

Am Ende dieses Schrittes hat also eine Verdopplung der spezifischen Sequenz des „DNA-Templates“ stattgefunden. Durch mehrfache Wiederholung dieser Schritte kann also theoretisch eine exponentielle Zunahme der Amplifikate der gesuchten Sequenz erreicht werden. Tatsächlich jedoch fällt die Amplifikationsgeschwindigkeit nach höheren Zykluszahlen wieder ab, so dass erst eine lineare und anschließend eine Plateauphase erreicht wird. Dies ist bedingt durch eine Ansammlung von Pyrophosphat sowie durch eine Abnahme an Primern und dNTPs. Des Weiteren lagern sich während des „Annealings“ zunehmend anstatt der Primer bereits gebildete Amplifikate an die DNA-Einzelstränge (siehe auch Abbildung II-6).

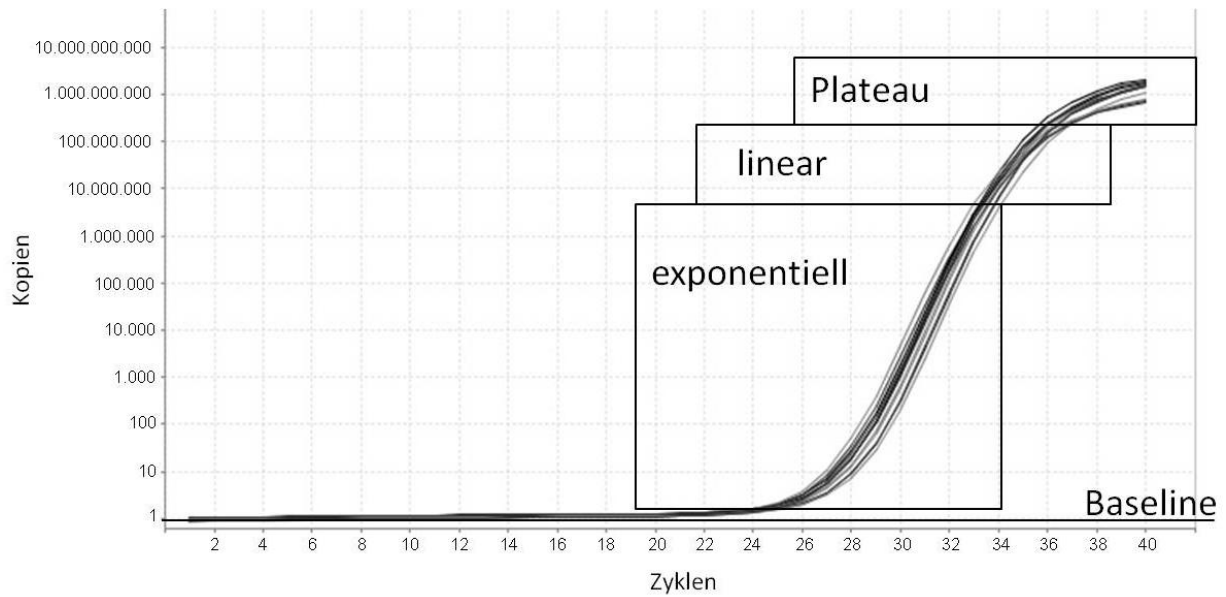


Abbildung II-6

Anzahl der Kopien der amplifizierten DNA-Sequenz gegen die Anzahl der Zyklen: Zu Beginn verläuft die Amplifikation exponentiell, später sinkt die Geschwindigkeit der Amplifikation, so dass erst die lineare, später die Plateau-Phase erreicht wird.

Hier wurde die PCR mit den Primern aus Tabelle II-2 und den Protokollen aus Tabelle II-3 und Tabelle II-4 durchgeführt. Das Protokoll der PCR zur Genotypisierung der Tiere wurde von The Jackson Laboratory zur Verfügung gestellt (<http://jaxmice.jax.org/protocolsdb>).

Primer	Sequenz	Hersteller
NF-IL6-mouse-WT (FW)	AAGACGGTGGACAAGCTGAG	Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg
NF-IL6-mouse-WT (BW)	GGCAGCTGCTTGAACAAGTTC	Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg
NF-IL6-Mutant	CATCAGAGCAGCCGATTGTC	Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg

Tabelle II-2

Verwendete Primer zur Amplifikation der DNA-Proben bei der Genotypisierung der Mäuse

Substanz	Menge je Probe
RedTaq DNA-Polymerase	7,5 µl
Autoklaviertes ddH ₂ O	3,9 µl
Primer 1 NF-IL6-mouse-WT (FW)	0,6 µl
Primer 2 NF-IL6-mouse-WT (BW)	0,6 µl
Primer 3 NF-IL6-Mutant	0,6 µl
Einsatz: 13,2 µl Mastermix + 1,8 µl Probe	

Tabelle II-3
Zusammensetzung des Mastermixes für die PCR

Schritt	Temperatur	Zeit
1	94°C	3 min
2	94°C	30 s
3	64°C	30 s
4	72°C	2 min
5	4°C	∞
Wiederholung der Schritte 2-4 34 mal (insgesamt 35 Zyklen)		

Tabelle II-4
PCR-Protokoll

2.2.4.4 Gel-Elektrophorese und Auswertung

Die qualitative Detektion der PCR-Endprodukte erfolgte mittels Gelelektrophorese (Dallas et al. 1989). Dazu wird das PCR-Reaktionsgemisch in ein Agarose-Gel gegeben, an welches dann eine Spannung angelegt wird. Die im Reaktionsgemisch vorhandenen DNA-Fragmente wandern dabei vom Minus-Pol zum Plus-Pol. Die Geschwindigkeit ihrer Wanderung hängt von ihrer Größe ab: kurze DNA-Fragmente wandern schneller als lange Fragmente, so dass mit Hilfe einer DNA-Leiter mit definierten Fragmentgrößen eine Einschätzung der Größe eines Amplifikats möglich ist. Die DNA wird dabei mit Ethidiumbromid angefärbt und kann anschließend unter UV-Licht (254 nm) sichtbar gemacht werden. Die Intensität der Fluoreszenz ist dabei proportional zur Menge des Amplifikats. Dennoch eignet sich diese Methode hauptsächlich für den qualitativen Nachweis der DNA-Amplifikate, da lediglich die

Endprodukte der PCR nachgewiesen werden, jedoch keine Aussage über die Reaktionskinetik während der PCR getroffen werden kann.

EDTA-Stammlösung 0,5 M	
93,05 g	EDTA
NaOH (pH einstellen)	Auf 8,0
Auf 500 ml auffüllen	ddH ₂ O
Durch Sterilfilter filtrieren und autoklavieren	
TBE-Stammlösung	
54 g	Trizma Base
27,5 g	Borsäure
20 ml	EDTA-Stammlösung 0,5 M
NaOH (pH einstellen)	Auf 8,26-8,3
Auf 1 l auffüllen	ddH ₂ O
TBE-Gebrauchslösung	
100 ml	TBE-Stammlösung
900 ml	ddH ₂ O

Tabelle II-5

Herstellung der TBE-Gebrauchslösung für die Gelelektrophorese

Hier wurde ein 2%iges Agarose-Gel verwendet. Dazu wurde 1g Agarose mit 50 ml TBE-Gebrauchslösung (Tabelle II-5) gemischt, in der Mikrowelle kurz aufgekocht und anschließend unter Rühren abgekühlt bis die Mischung noch etwa handwarm war. Anschließend wurden 2,5 µl Ethidiumbromid hinzu gegeben und die Lösung luftblasenfrei in eine Gel-Gießform gegossen. Durch Einstecken eines 18er-Kamms in das Gel wurden die Taschen geformt, in die später die DNA-Probe gegeben wurde. Die Aushärtung des Gels dauerte ca. 30 Minuten. Im Anschluss wurde der Kamm vorsichtig entfernt und das Gel in die Elektrophorese-Kammer eingesetzt. Die Kammer wurde anschließend mit TBE-Gebrauchslösung gefüllt bis das Gel vollständig bedeckt war. In die erste Tasche des Gels wurden dann 3 µl einer 100bp-DNA-Leiter gegeben, in die folgenden Taschen je 6 µl der DNA-Proben. Die letzte Tasche wurde mit 6 µl Blank gefüllt. Dies ist eine Probe aus der PCR, bei der anstatt einer DNA-Probe nur steriles Wasser zugegeben wurde, die ansonsten jedoch genauso behandelt wurde, wie alle anderen Proben. Sie dient zur Kontrolle auf

Verunreinigungen in der PCR. Die Elektrophorese wurde dann bei 100 V und 1 A für 30 Minuten durchgeführt. Die so aufgetrennte und durch das im Gel vorhandene Ethidiumbromid angefärbte DNA wurde durch UV-Licht im Molecular Imager sichtbar gemacht und fotografiert. Anhand der DNA-Leiter konnte anschließend die Größe der detektierten Fragmente bestimmt werden. Proben von Wildtyp (WT)-Tieren enthielten lediglich eine Bande bei 211 bp, Proben von Knockout-Tieren bei 396 bp, während heterozygote Tiere beide Banden zugleich aufwiesen (siehe auch Abbildung II-7).

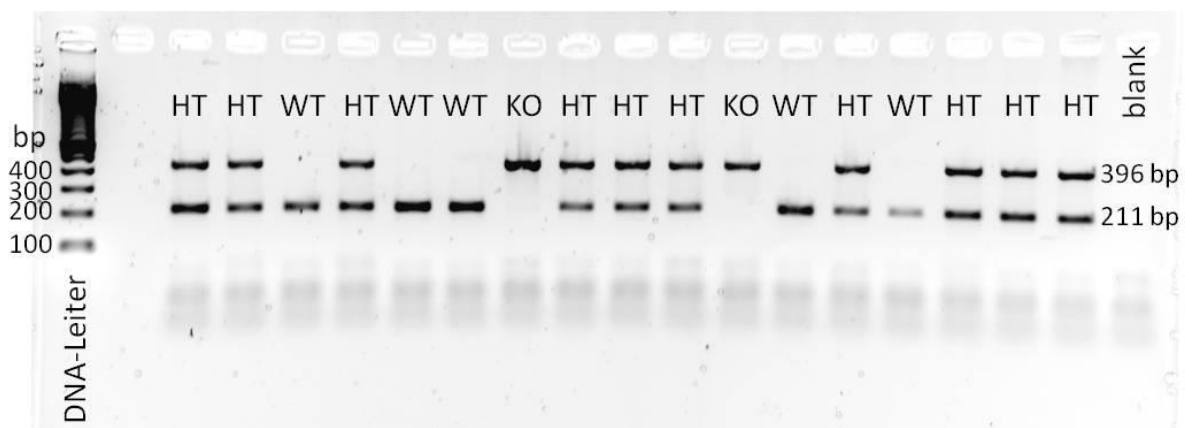


Abbildung II-7

Typisches Beispiel für eine Gelelektrophorese zur Genotypisierung der Mäuse: Links die 100bp-DNA-Leiter gefolgt von 17 Proben und ganz rechts die Blank zur Kontrolle auf Verunreinigungen. Wildtyp-Tiere (WT) weisen eine Bande bei 211 bp auf, Knockout-Tiere (KO) bei 396 bp, heterozygote Tiere (HT) zeigen beide Banden.

Es fiel außerdem auf, dass Knockout- und Wildtyp-Tiere einen leicht unterschiedlichen Phänotyp zeigten. Die Knockout-Tiere waren meist etwas kleiner als die Wildtyp-Geschwister und wiesen ein weniger glänzendes Fell sowie teilweise Veränderungen an den Augen auf.

2.2.5 Sentinel-Tiere

Zur Überwachung des Gesundheitsstatus der Tiere im Stall wurden, zusätzlich zur monatlichen klinischen Untersuchung der Tiere, vierteljährlich Kontrollen durchgeführt. Dazu wurden die CD1-Mäuse als Sentinel-Tiere verwendet. In die Käfige der CD1-Mäuse wurde einmal im Monat Einstreu aus den Käfigen des NF-IL6-

Knockout-Stammes übertragen. Somit wurde sichergestellt, dass die CD1-Mäuse immer den gleichen Gesundheitsstatus wie alle anderen Tiere im Stall hatten. Alle 3 Monate wurde dann ein männliches, drei bis vier Monate altes Tier mittels CO₂-Narkose und anschließender zervikaler Dislokation getötet und gemäß der Richtlinien der FELASA-Working Group untersucht (Nicklas et al. 2002). Zur bakteriologischen Untersuchung durch das Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der Justus-Liebig-Universität Gießen wurden Tupferproben von Präputium, Rachen und Caecum-Inhalt entnommen. Des Weiteren wurde unmittelbar nach der Tötung eine Blutprobe direkt aus dem Herzen entnommen. Diese diente der Gewinnung von Serum, welches anschließend serologisch durch MFD Diagnostics untersucht wurde. Einmal jährlich wurde zudem ein Darmstück zur Untersuchung auf *Helicobacter* durch MFD Diagnostics entnommen. Eine parasitologische Untersuchung erfolgte durch das Institut für Parasitologie der Justus-Liebig-Universität Gießen. Als Probenmaterial hierzu diente Enddarmkot, welcher in SAF-Medium (Natriumacetat – Essigsäure – Formalin) verbracht wurde sowie Caecuminhalt. Es erfolgte außerdem eine makroskopische Untersuchung des Tieres auf Ektoparasiten sowie eine mikroskopische Untersuchung eines Tesafilm-Anal-Abklatsch-Präparates. Der Tierkörper wurde anschließend in 4%igem Formalin fixiert und durch das Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen untersucht.

Die serologischen sowie die parasitologischen Untersuchungen waren stets negativ. In den bakteriologischen Untersuchungen wurden meist geringe Mengen physiologischer Haut-, Schleimhaut- und Darmkommensalen nachgewiesen. Die pathologische Untersuchung zeigte meist agonale Stauungen in Leber und Lunge, jedoch keine Anzeichen für Infektionskrankheiten.

Erreger	Probenmaterial	Methode	Frequenz
Untersuchungen durch MFD Diagnostics			
<i>Clostridium piliforme</i>	Serum	ELISA	3 Monate
<i>Ectromelia virus</i>	Serum	ELISA	jährlich
EDIM (Rotavirus)	Serum	ELISA	3 Monate
GD-VII (Theiler's Murine Encephalomyelitis virus)	Serum	ELISA	3 Monate
Virus der lymphozytären Choriomeningitis	Serum	ELISA	jährlich
Murines Adenovirus Typ 1 & 2	Serum	ELISA	jährlich
Zytomegalievirus der Maus	Serum	ELISA	jährlich
Murines Hepatitisvirus	Serum	ELISA	3 Monate
Murines Parvovirus	Serum	ELISA	3 Monate
Minute Virus der Maus	Serum	ELISA	3 Monate
<i>Mycoplasma pulmonis</i>	Serum	ELISA	3 Monate
Pneumonievirus der Maus	Serum	ELISA	3 Monate
Reovirus Typ 3	Serum	ELISA	jährlich
Sendai Virus	Serum	ELISA	3 Monate
<i>Helicobacter spp.</i>	Darmstück	PCR	jährlich
Untersuchungen durch das Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere			
<i>Citrobacter rodentium</i>	Tupfer	Anzucht	3 Monate
<i>Corynebacterium kutscheri</i>	Tupfer	Anzucht	3 Monate
<i>Pasteurellaceae</i>	Tupfer	Anzucht	3 Monate
<i>Salmonella spp.</i>	Tupfer	Anzucht	3 Monate
β-hämolysierende Streptokokken	Tupfer	Anzucht	3 Monate
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Tupfer	Anzucht	3 Monate
<i>Streptobacillus moniliformis</i>	Tupfer	Anzucht	jährlich
Untersuchungen durch das Institut für Parasitologie			
Untersuchung auf Endoparasiten	Enddarm- und Caecumkot	Sedimentation und Flotation	3 Monate

Tabelle II-6

Untersuchungsmaterial und angewandte Methoden sowie Untersuchungsfrequenz zum Nachweis verschiedener Erkrankungen bei den Sentinel-Tieren.

2.3 Versuchsaufbau und Ablauf

Ein bis drei Tage vor Beginn des Versuchs wurden die für den Versuch vorgesehenen Tiere (maximal 5 Tiere gleichzeitig) in Einzelkäfige (Polycarbonat-Käfige Typ III)

umgesetzt und in die Klimakammer verbracht. Dort hatten sie vor Versuchsbeginn Zeit, sich an die neue Umgebung zu gewöhnen. In der Klimakammer herrschten eine Temperatur von 31°C sowie eine relative Luftfeuchtigkeit von 50%. Da die Tiere während des Versuchs einzeln gehalten wurden, fehlte ihnen die Möglichkeit zur sozialen Thermoregulation, deshalb musste die Umgebungstemperatur in der Klimakammer höher liegen als im Zucht- und Haltungsraum. Außerdem entspricht diese Temperatur der Thermoneutraltemperatur von Mäusen (Gordon 2012). Auch in der Klimakammer wurde ein 12 h : 12 h Beleuchtungsprogramm (Licht von 7:00 bis 19:00 Uhr) verwendet. Futter und Wasser standen den Tieren auch hier *ad libitum* zur Verfügung.

Nach dieser Eingewöhnungsphase wurde den Tieren intraabdominal ein Radiotransmitter eingesetzt, mit dem, mit Hilfe einer Empfängerplatte unter dem Käfig, die Körperkerntemperatur sowie die Aktivität der Mäuse aufgezeichnet werden konnte (siehe Kapitel 2.4). Die folgenden 6 bis 7 Tage dienten der Rekonvaleszenz der Tiere. In dieser Zeit wurden die Tiere jeden Morgen gegen 9:00 Uhr „gehandelt“, gewogen und die OP-Wunde sowie die Körpertemperatur kontrolliert. Dadurch wurden die Mäuse an das Handling gewöhnt, so dass die Injektionen bei den Tieren möglichst stressarm durchgeführt werden konnten. Durch Adspektion der Wunde und Kontrolle der Körperkerntemperatur konnte die Rekonvaleszenz der Tiere nach der OP überwacht werden.

Nach der Rekonvaleszenz wurden die Tiere einer neuen Umgebung ausgesetzt, indem sie in die Messkäfige umgesetzt wurden. Die dabei gesammelten Daten dienten als Maß für den so genannten „novel environment stress“ (NES; siehe Kapitel 2.5). Die Messkäfige bestanden aus durchsichtigem Plexiglas und einem abnehmbaren, luftdurchlässigen Deckel. Sie ermöglichten zusätzlich zur Aufzeichnung der Körperkerntemperatur sowie der Aktivität auch die Messung und Aufzeichnung der Futter- und Wasseraufnahme der Tiere. Dazu wurden die Wasserflasche und die Schale mit dem Futter jeweils auf einer Waage platziert, die ebenfalls mit dem PC verbunden war. Um eine genaue Messung der Futteraufnahme zu ermöglichen wurde hier Futtermehl verwendet. Das Futter war für die Mäuse durch einen Tunnel zu

erreichen, die Wasserflasche war durch einen Schlauch mit einem Tränkenippel im Käfig verbunden (siehe Abbildung II-8).

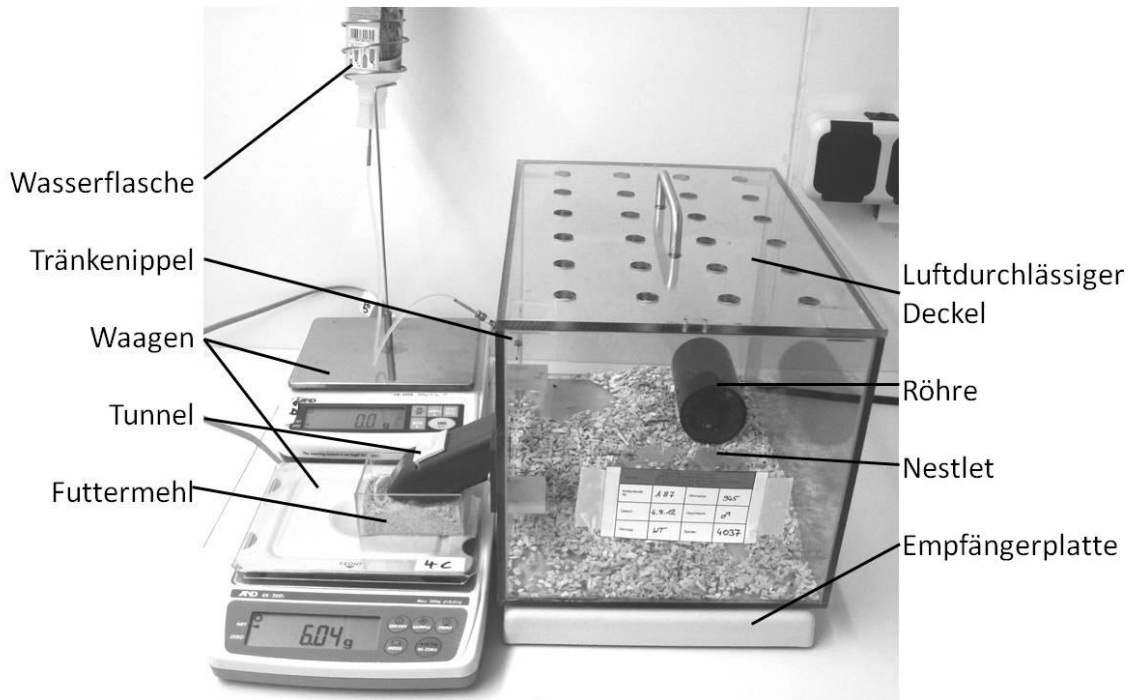


Abbildung II-8
Aufbau und Ausstattung des Messkäfigs.

3 bis 5 Tage nach dem NES erhielten die Tiere in einer ersten intraperitonealen Injektion entweder eine niedrige LPS-Dosis (50 µg/kg) oder „phosphate-buffered saline“ (PBS). Wieder 3 bis 5 Tage später erhielten sie in einer zweiten Injektion entweder eine hohe LPS-Dosis (2,5 mg/kg) oder PBS (siehe Kapitel 2.6). Jedes Tier wurde allerdings lediglich einmal mit LPS stimuliert.

8 oder 24 h nach der zweiten Injektion wurden die Tiere dann transkardial perfundiert und Proben entnommen (siehe Kapitel 2.7).

Die Tierversuche wurden vor Versuchsbeginn durch das Regierungspräsidium Hessen genehmigt (Projektnummer GI 18/2 - 51/2008).

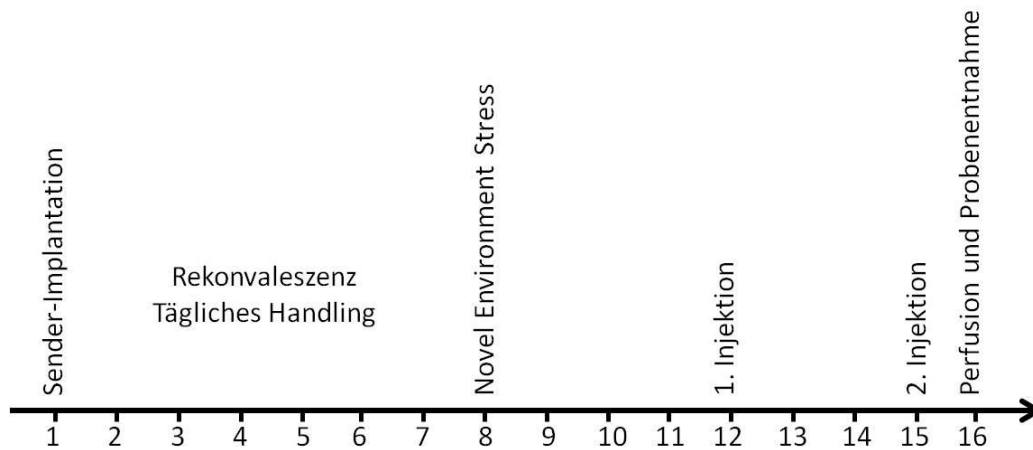


Abbildung II-9

Schematische Darstellung des Versuchsablaufs.

2.4 Operation

Vor der Operation erhielten die Mäuse eine orale Prämedikation mit dem nichtsteroidalen anti-inflammatorischen Analgetikum Meloxicam (1 mg/kg). Als Anästhetikum wurde eine Mischung aus 1 ml Ketamin, 0,25 ml Xylazin und 5 ml steriler NaCl-Lösung verwendet. Von dieser Mischung erhielten die Mäuse je nach Gewicht zwischen 0,18 und 0,23 ml als intraperitoneale Injektionsnarkose. Das Erreichen des chirurgischen Toleranzstadiums wurde mittels Zwischenzehenreflex und Kornealreflex überprüft. Um einen übermäßigen Abfall der Körperkerntemperatur der Mäuse zu verhindern wurden alle folgenden Schritte auf Wärmematten durchgeführt. Eine Austrocknung der Cornea während der Narkose wurde durch Auftragen eines Augengels verhindert. Anschließend wurde der Operationsbereich geschoren und dreimal für 1 Minute mit Cutasept desinfiziert. Zur Laparotomie wurde zunächst die Haut caudal des Nabels auf ca. 1 cm Länge in der Medianen mit einem Skalpell eingeschnitten. Mit einer stumpfen Schere wurden anschließend Haut und Unterhaut von der Bauchmuskulatur gelöst, die Bauchmuskulatur dann mit Hilfe einer chirurgischen Pinzette vorsichtig angehoben, woraufhin die Bauchhöhle durch eine Inzision in der *linea alba* eröffnet wurde. Unter dem Schutz einer Pinzette wurde die Öffnung dann mit einer Metzenbaum-Schere so erweitert, dass der zu implantierende Sender hindurch passte. Die Sender wurden nun in 70% Ethanol desinfiziert, mit steriler NaCl-Lösung abgespült und in die Bauchhöhle eingelegt. Anschließend wurde

erst die Bauchmuskulatur mit einem resorbierbaren Nahtmaterial, anschließend die Haut mit einem nicht-resorbierbaren Nahtmaterial in Einzelheften verschlossen. Abschließend wurde die Wunde nochmal mit Polyvidon-Iod-Lösung gesäubert und desinfiziert und mit einem Aluminium-Spray abgedeckt. Die Operation wurde, mit meiner Assistenz, von Prof. Dr. Joachim Roth durchgeführt.

In der folgenden Aufwachphase wurden die Tiere weiterhin mit einer Wärmematte und einer Rotlicht-Lampe gewärmt und regelmäßig kontrolliert. Nach der OP erhielten die Tiere außerdem für zwei bis drei weitere Tage das Analgetikum Meloxicam. Zusätzlich wurden täglich die Wunde, das Körpergewicht, der Allgemeinzustand der Tiere sowie Körperkerntemperatur und Aktivität kontrolliert.



Abbildung II-10
Radio-Transmitter zur Implantation in die Bauchhöhle der Mäuse

2.5 „Novel environment stress“

Zur Induktion des „novel environment stress“ (neue Umgebung) wurden die Mäuse am entsprechenden Versuchstag morgens um 10:00 Uhr aus den Polycarbonat-Typ-III-Käfigen in die Messkäfige umgesetzt. Die neue Umgebung induzierte eine deutliche Stress-Reaktion und eine stress-induzierte Hyperthermie in den Mäusen (Kluger et al. 1987; Zethof et al. 1994). Nach 4 Stunden hatten sich die Mäuse bereits an das „novel environment“ gewöhnt und die Aufzeichnung der Stressantwort wurde abgeschlossen.

2.6 Injektionen

Das für die Induktion der systemischen Entzündungsreaktion verwendete LPS wurde unter sterilen Bedingungen in steriler PBS gelöst. Es wurden Lösungen mit zwei

verschiedenen Konzentrationen hergestellt: 500 µg/ml und 10 µg/ml. Die Lösungen wurden, ebenso wie sterile PBS, aliquotiert und eingefroren.

Alle Injektionen wurden zwischen 9:00 und 11:00 Uhr durchgeführt. Eine Stunde vor der Injektion wurde die LPS-Lösung sowie die sterile PBS aufgetaut und auf Körpertemperatur angewärmt. Die intraperitoneale Injektion erfolgte mit einer sterilen Einwegspritze rechts der Medianen in der *regio umbilicalis*. Das Injektionsvolumen betrug 5 µl/g Körpergewicht.

Es wurden zwei unterschiedliche LPS-Dosierungen verwendet: Eine hohe Dosis mit 2,5 mg/kg und eine niedrige Dosis mit 50 µg/kg Körpergewicht (KGW). Kontrolltiere erhielten ein identisches Volumen an PBS.

Um die Erhebung möglichst vieler Daten bei gleichzeitiger Minimierung der Tierzahlen zu ermöglichen, wurden die Tiere zweimal injiziert (siehe Tabelle II-7). Dabei wurde jedes Tier nur einmal mit LPS stimuliert, um eine Gewöhnung / Toleranz an die Stimulation mit LPS zu vermeiden.

Gruppe	1. Injektion	2. Injektion
A	PBS	2,5 mg/kg LPS (5 µl/g der 500 µg/ml-Lösung)
B	50 µg/kg LPS (5 µl/g der 10 µg/ml-Lösung)	PBS

Tabelle II-7

Tiere der Gruppe A erhielten in der ersten Injektion „phosphate-buffered saline“ (PBS) und in der 2. Injektion 3 bis 5 Tage später die hohe Lipopolysaccharid (LPS)-Dosis. Tiere der Gruppe B erhielten bei der ersten Injektion die niedrige LPS-Dosis und bei der zweiten Injektion PBS.

Die Zuteilung zu den Gruppen A und B erfolgte zufällig.

2.7 Perfusion und Probenentnahme

8 oder 24 h nach der zweiten Injektion wurden die Tiere mit 100-160 mg/kg KGW Pentobarbital i.p. in eine sehr tiefe, terminale Narkose versetzt und in Rückenlage auf einem Metallgitter über einer Wanne zum Auffangen der Perfusionslösung fixiert. Anschließend wurden mit Hilfe einer chirurgischen Pinzette und einer Schere die Bauch- und die Brusthöhle eröffnet, indem von der Bauchdecke caudal des Sternums

ausgehend je ein Schnitt auf jeder Seite zum Rippenbogen geführt wurde. Einige Rippen wurden durchtrennt und das Diaphragma gelöst, so dass das Sternum zusammen mit den Rippen-Ansätzen nach cranial gebogen und dort mit einer Klemme fixiert werden konnte. Dadurch wurde ein guter Blick auf das Herz und die Brustorgane ermöglicht. Nach Eröffnung des Perikards wurde nun mit einer sterilen, heparinisierten Spritze eine Blutprobe aus dem rechten Ventrikel entnommen. Bei den NF-IL6-Knockout-Tieren fiel auf, dass diese meist um den implantierten Sender eine flüssigkeitsgefüllte Kapsel gebildet hatten. Der Inhalt dieser Kapsel wurde mit einer weiteren sterilen Spritze entnommen. Anschließend wurde die Perfusionskanüle in den linken Ventrikel gestochen. Diese war durch einen Schlauch mit einem Perfusor verbunden, welcher tropfenweise (Geschwindigkeit 7-8) eiskalte 0,9%ige NaCl-Lösung durch den Blutkreislauf der Maus pumpte. Ein Abfluss des Blutes sowie der Perfusionslösung wurde durch Eröffnung des rechten Vorhofes ermöglicht. Auf diese Weise wurden die Tiere vollständig entblutet, was durch eine zunehmende Blässe der Leber und das Klarwerden der aus dem Vorhof austretenden Flüssigkeit kontrolliert werden konnte.

Anschließend wurde der Kopf des Tieres zwischen dem zweiten und dritten Halswirbel abgetrennt und die Haut nach cranial vom Schädel abgezogen. Von caudal beginnend wurden dann mit Hilfe einer Knochenzange die verbliebenen Wirbelkörper und Muskelreste entfernt, von den *condyli* ausgehend vorsichtig die Schädelplatten bis zum *bregma* entfernt und somit das Gehirn freigelegt. Die Hirnhäute wurden entfernt und die ventral austretenden Gehirnnerven durchtrennt. Mit einem Metallspatel konnte dann das Riechhirn durchtrennt und das Gehirn aus der *cavum cranii* entnommen werden. Mit einer Skalpellschneide wurde das Gehirn in der *fissura transversa cerebri* durchtrennt und somit in Großhirn und Kleinhirn mit Stammhirn geteilt. Der Hypothalamus wurde mit „tissue freezing medium“ überschichtet, um die fragilen Strukturen zu schützen und somit die Anfertigung von Gefrierschnitten am Kryostat zu erleichtern. Die Hypophyse verblieb bei der Entnahme des Gehirns meist im *sella turcica*, woraus sie mit Hilfe eines Metallspatels entnommen und in eine Plastikschaale

überführt werden konnte. Auch die Hypophyse wurde mit „tissue freezing medium“ geschützt.

Des Weiteren wurden aus der bereits eröffneten Bauchhöhle mit Hilfe einer Pinzette und einer kleinen, spitzen Schere die Milz, der linke Leberlappen sowie eine Probe subcutanen Fettes aus der seitlichen Bauchwand entnommen. Bei den NF-IL6-Knockout-Tieren wurde außerdem noch eine Probe der um den Sender gebildeten Kapsel entnommen.

Alle entnommenen Gewebeproben wurden sofort nach der Entnahme in pulverisiertem Trockeneis schockgefroren und anschließend luftdicht in Parafilm, lichtgeschützt in Alufolie und zusätzlich in eine luftdichte Plastiktüte verpackt und bis zur weiteren Verwendung bei -54°C gelagert. Von den Blut- und Kapselproben wurden Ausstriche angefertigt und die Proben anschließend 5 Minuten bei 7.000 Umdrehungen pro Minute (rpm) zentrifugiert. Der so gewonnene Überstand bzw. das Blutplasma wurden bis zur Analyse bei -20°C gelagert. Um eine möglichst schnelle Entnahme der Proben zu gewährleisten wurde die Perfusion und anschließende Probenentnahme zusammen mit PD Dr. Christoph Rummel durchgeführt.

2.8 Erfassung physiologischer Daten

2.8.1 Telemetrische Datenerfassung

Die telemetrischen Sender (Radio-Transmitter), mit denen Körperkerntemperatur (Tb) und Aktivität der Mäuse aufgezeichnet wurden, bestehen aus zwei Polyethylen-Zylindern, die die Messelektronik umschließen. Die Energieversorgung der Sender wird durch eine Knopfzelle gewährleistet. Um ein Eindringen von Feuchtigkeit in die Sender zu verhindern, wurden diese mit einer Paraffin-Mischung überzogen. Die Temperaturmessung beruht auf einem wärmeabhängigen Transistor mit negativem Temperaturkoeffizienten. Dieser emittiert ein Radiosignal, dessen Frequenz proportional zur Temperatur ist. Eine steigende Temperatur verursacht also eine erhöhte Signalfrequenz, und umgekehrt. Eine Eichung der Sender auf die Signalfrequenzen bei den Temperaturen $37 \pm 0,1$ °C und $41 \pm 0,1$ °C ermöglichte eine präzise Messung der Körperkerntemperatur der Mäuse. Die unter dem Käfig platzierte

Empfänger-Platte detektierte dieses Signal und leitete es über den Dataport an den PC weiter, wo die Temperatur durch das Programm VitalView aufgezeichnet wurde. Die Datenerfassung erfolgte alle 5 Minuten.

Die simultane Aufzeichnung der lokomotorischen Aktivität basiert auf einem in dem Sender enthaltenen Trägheitselement, das Signale emittiert, deren Stärke von der Entfernung vom Empfänger abhängt. Die Änderung der Signalstärke ist also ein Maß für die lokomotorische Aktivität der Mäuse und wird als „activity counts“ in einem festgelegten Zeitintervall (5 min) erfasst. Auch diese Daten wurden mit Hilfe des Programmes VitalView aufgezeichnet.

Zur Aufzeichnung der Futter- und Wasseraufnahme durch die Tiere wurden der Futterbehälter und die Wasserflasche jeweils auf Waagen platziert und diese tariert. Die Waagen waren über den Dietscan Analyzer mit dem PC verbunden. Dieser erfasste mit Hilfe des Programms Accudiet im 5 minütigen Abstand jeweils die Änderung des auf der Waage befindlichen Gewichts und somit die Menge des aufgenommenen Futters oder Wassers.

Da diese Messungen automatisiert stattfanden, war eine kontinuierliche, für die Tiere stressfreie Datenerfassung möglich.

2.8.2 Erfassung des Körpergewichts

Im Rahmen des täglichen Handlings wurden die Tiere während des Versuchs jeden Morgen gegen 9 Uhr gewogen. Aus den so ermittelten Werten konnte für jeden Tag die tägliche Gewichtsveränderung prozentual vom KGW errechnet werden. Diese konnte während der postoperativen Phase als einer der Indikatoren für die Rekonvaleszenz der Tiere herangezogen werden und war außerdem ein Hinweis für die Reaktion der Tiere auf die applizierten Substanzen.

2.8.3 Auswertung und Statistik

2.8.3.1 Körperkerntemperatur

Die von den Sendern aufgezeichneten Daten über die Körperkerntemperatur der Mäuse wurden aus dem Programm Vitalview als Excel-Tabelle exportiert. Zur

Auswertung wurden jeweils die Daten ab zwei Stunden vor einer Injektion bzw. vor dem „novel environment stress“ bis 24 Stunden nach der Injektion oder bis zur Perfusion der Tiere bzw. bis 4 h nach dem NES herangezogen. Die Temperaturdaten wurden auf 15-Minuten-Intervalle reduziert; zur graphischen Darstellung wurden für jede Gruppe Mittelwert \pm Standardfehler verwendet.

Zur statistischen Auswertung wurden die Daten zusätzlich in 2-h-Intervalle unterteilt (1-h-Intervalle beim NES). Bei den Injektionen wurde mit der statistischen Auswertung beim Zeitpunkt 1 h nach der Injektion begonnen. Dadurch wurde einerseits der Stresspeak, den alle Tiere gleichermaßen als Reaktion auf Handling und Injektionen zeigten, aus der Verlaufsanalyse ausgeschlossen, andererseits wurde so erreicht, dass die Grenzen zwischen Hell- und Dunkelphase jeweils mit einer Intervall-Grenze zusammenfielen. Mäuse haben physiologischerweise während der Dunkelphase eine höhere Körperkerntemperatur als während der Hellphase (Gordon 2012), weshalb eine Trennung zwischen beiden Phasen für die Auswertung sinnvoll ist. Für jedes dieser Intervalle wurde anschließend eine drei-faktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit Messwiederholungen durchgeführt, wobei Genotyp und Behandlung die beiden Faktoren und die Messwiederholungen über die Zeit die abhängigen Variablen waren. Durch die Aufteilung der Daten in Intervalle wurden somit mehrere statistische Auswertungen an einem Datensatz angewendet. Da dies zu einem gewissen Fehlerpotential führt, wurden anschließend die p-Werte nach Bonferroni adjustiert. Dazu wurden die aus der ANOVA erhaltenen p-Werte (Haupteffekte Genotyp und Behandlung und die Interaktion) mit der Anzahl der Intervalle, in die der jeweilige Datensatz unterteilt wurde (12 nach den Injektionen bzw. 4 nach dem NES), multipliziert. Nur p-Werte die nach dieser Adjustierung noch kleiner als 0,05 waren, wurden als statistisch signifikant angesehen, wodurch eine Fehlerwahrscheinlichkeit von $< 5\%$ gewährleistet wurde. Diese Fehlerwahrscheinlichkeit wurde auch in allen anderen statistischen Tests verwendet. Im Falle einer signifikanten Interaktion zwischen Genotyp und Behandlung wurde außerdem noch ein *post-hoc* Test nach Tukey durchgeführt, mit dem die einzelnen biologischen Gruppen untereinander verglichen werden konnten. In der graphischen Darstellung von Ergebnissen wurden

signifikante Unterschiede immer mit verschiedenen Symbolen gekennzeichnet (*, +, #, §, \$,...). Die Anzahl der Symbole zeigt dabei verschiedene Signifikanz-Stufen an: * $\triangleq p < 0,05$; ** $\triangleq p < 0,01$; *** $\triangleq p < 0,001$. Die statistische Auswertung wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Gerrit Eichner (Mathematisches Institut) optimiert.

2.8.3.2 Aktivität

Auch die Daten über die lokomotorische Aktivität der Tiere wurden als Excel-Tabelle aus VitalView exportiert. Die Daten ab der Injektion bzw. Beginn des NES bis 24 h nach der Injektion oder bis zur Perfusion bzw. bis 4 h nach Beginn des NES wurden zur Analyse verwendet. Auch hier wurden die Daten als Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt.

Die Auswertung der Aktivität der Tiere erfolgte auf zwei verschiedene Arten: Zum einen wurde – ähnlich der Körperkerntemperatur – der Verlauf der Aktivität auf 15-minütige Intervalle reduziert und, unterteilt in 2-h-Intervalle, mit Hilfe einer dreifaktoriellen ANOVA mit Messwiederholungen analysiert. Zum anderen wurde die Aktivität der einzelnen Tiere kumulativ, das heißt als Summe der „activity counts“, über ein 24-h-Intervall nach der Injektion berechnet. Diese Daten wurden anschließend durch das Programm GraphPad Prism mit einer zwei-faktoriellen ANOVA mit den Faktoren Genotyp und Behandlung ausgewertet. Bei einer positiven Interaktion zwischen Genotyp und Behandlung ($p < 0,05$) wurde außerdem ein *post-hoc* Test nach Bonferroni durchgeführt. Werte, die mehr als die 1,5-fache „interquartile-range“ (IQR) unter dem 25%-Perzentil oder über dem 75%-Perzentil lagen, wurden als Ausreißer angesehen und aus der statistischen Auswertung entfernt.

2.8.3.3 Futter- und Wasseraufnahme

Die von dem Programm Accudiet erfassten Mengen aufgenommenen Futters und Wassers der Tiere wurden mit Hilfe von Excel kumulativ über 8 und 24 h berechnet. Dabei wurde außerdem die Futter- und Wasseraufnahme in Prozent des Körpergewichts berechnet. Die Darstellung der Daten erfolgte für jede experimentelle Gruppe als Mittelwert \pm Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte durch eine zwei-faktorielle ANOVA (Faktoren: Genotyp und Behandlung), gefolgt von

einem Bonferroni *post-hoc* Test im Falle einer positiven Interaktion durch das Programm GraphPad Prism.

2.8.3.4 Körpergewicht

Die Änderung des Körpergewichts pro Tag wurde ebenfalls in Prozent des Körpergewichts berechnet und für jede Gruppe als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben. Auch hier erfolgte die statistische Auswertung durch eine 2-faktorielle ANOVA.

2.8.3.5 Vergleich zwischen männlichen und weiblichen Tieren

Für die Versuche wurden sowohl männliche als auch weibliche Tiere verwendet. Um einen Einfluss des Geschlechts auf die Versuchsergebnisse auszuschließen, wurden verschiedene statistische Tests durchgeführt. Dazu wurden die Temperaturdaten wie oben beschrieben jedoch mit einer vier-faktoriellen ANOVA mit Messwiederholung mit den Faktoren Genotyp, Geschlecht, Behandlung und Zeit analysiert. Die Daten der kumulativen Aktivität wurden jeweils für die Zeitpunkte 8 und 24 h mit einer dreifaktoriellen ANOVA mit den Faktoren Genotyp, Behandlung und Geschlecht analysiert. Ebenso wurde mit den Ergebnissen verschiedener inflammatorischer Mediatoren (Plasma-IL-6- und -IL-10-Level, hypothalamische Expression von NF κ B, IL-10, IL-1 β , IL-1ra, IL-6, TNF α , iNOS, mPGES, COX2, TPH2, IDO, CXCL1) und den Plasma-Corticosteron-Spiegeln verfahren. Auf diese Weise konnte bei den meisten durchgeführten Tests ein Einfluss des Geschlechts auf die Ergebnisse ausgeschlossen werden (keine statistische Signifikanz beim Haupteffekt Geschlecht oder dessen Interaktionen). Lediglich bei dem Temperaturverlauf in Reaktion auf die niedrige LPS-Dosis im Intervall 17 bis 19 h und bei den Plasma-IL-6- und -IL-10-Spiegeln 24 h nach der Behandlung wurde eine statistische Signifikanz des Geschlechts oder einer Interaktion des Geschlechts mit Behandlung oder Genotyp festgestellt. In diesen Fällen wurden die statistischen Tests wiederholt, wobei nur die Daten der männlichen Tiere verwendet wurden. Diese Ergebnisse unterschieden sich nicht von den Ergebnissen der Tests, bei denen die Daten aller Tiere berücksichtigt wurden. Ein Einfluss des Geschlechts auf die vorliegenden Ergebnisse kann also ausgeschlossen werden.

3. *In vivo* Versuche am Douglas Mental Health University Institute, McGill University, Montréal, Canada

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien

Substanz	Hersteller
Kaninchen anti-PMN (polymorphnukleäre Leukozyten)-Antikörper	Accurate Chemical and Scientific Corporation, Westbury, NY, USA
Kaninchenserum (normal rabbit serum; NRS)	Accurate Chemical and Scientific Corporation, Westbury, NY, USA

3.2 Versuchstiere

Für diesen Versuch wurden 8 Wochen alte, männliche C57BL/6J-Mäuse verwendet. Die Mäuse stammten vom The Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA) und wurden im Tierstall des Douglas Mental Health University Institute in Kleingruppen gehalten. Die Tiere hatten konstanten Zugang zu Futter und Wasser. Die Umgebungstemperatur betrug $21 \pm 2,1$ °C und es wurde ein künstliches Beleuchtungsprogramm mit 12 h Licht (von 8:00 bis 20:00 Uhr) verwendet. Die Tierversuche wurden vom „The institutional Animal Care Committee“ entsprechend der „Canadian Council of Animal Care guidelines“ genehmigt und von Ke Cui durchgeführt.

3.3 Versuchsablauf

Um eine Neutropenie in den Mäusen zu erzeugen, wurde den Tieren zweimal im Abstand von 24 h 5µl/g KGW eines Antikörpers gegen PMN i.p. injiziert. Kontrolltiere erhielten zweimal ein gleiches Volumen Kaninchenserum (NRS). Zusammen mit der zweiten Injektion wurden die Tiere außerdem mit 2,5 mg/kg KGW LPS zur Induktion einer systemischen Entzündung oder mit steriler PBS stimuliert. Es gab also insgesamt 4 experimentelle Gruppen mit jeweils 5 Tieren (siehe Tabelle II-8). 48 h nach der zweiten Injektion wurden die Tiere dann perfundiert, anschließend die Gehirne entnommen, in der *fissura transversa cerebri* geteilt und in pulverisiertem

Trockeneis schockgefroren (siehe auch Kapitel II.2.7). Bis zur weiteren Verwendung wurden die Gehirne dann bei -80°C gelagert.

Gruppe	1. Injektion: 0 h	2. Injektion: 24 h
1	PMN-Antikörper	PMN-Antikörper + LPS
2	PMN-Antikörper	PMN-Antikörper + PBS
3	NRS	NRS + LPS
4	NRS	NRS + PBS

Tabelle II-8

Tiere der Gruppen 1 und 2 erhielten zweimal den Antikörper gegen polymorphnukleäre Leukozyten (PMN) zur Induktion einer Neutropenie. Anschließend erhielten die Tiere der Gruppe 1 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS) zur Induktion einer systemischen Entzündung, während die Tiere der Gruppe 2 „phosphate-buffered saline“ (PBS) erhielten. Die Tiere der Gruppen 3 und 4 erhielten Kaninchenserum (NRS) und anschließend LPS (Gruppe 3) bzw. PBS (Gruppe 4).

4. Immunfluoreszenz und Immunhistochemie

4.1 Materialien

4.1.1 Technische Geräte

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Fluoreszenz-Mikroskop	BX50	Olympus Corporation, Tokio, Japan
Kamera (Durchlichtmikroskopie)	Camedia C-3030 Zoom	Olympus Corporation, Tokio, Japan
Kamera (Immunfluoreszenz)	Spot Insight B/W	Visitron Systems GmbH, Puchheim
Kryostat	2800 Grigocut E	Reichert-Jung, Nußloch
Kryostat	HM 500 O	Microm International GmbH, Walldorf
Mikroskop (Labor)	Dialux 22 EB	Leitz GmbH und Co. KG, Stuttgart

4.1.2 Software

Bezeichnung	Hersteller
MetaMorph 7.7.5.0	Molecular Devices Inc., Downingtown, PA, USA

4.1.3 Chemikalien

Bezeichnung	Katalog-Nummer	Hersteller
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	D3571	MoBiTec, Göttingen
CitiFluor	AF1	CitiFluor LTD, London, UK
D3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid (DAB)	D5637	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Entellan	1.079.610.100	Merck, Darmstadt
Histoclear	HS-200	National diagnostics, Atlanta, GA, USA
Kresylviolett	61120	Fluka AG, Buchs, Schweiz
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat	1.063.461.000	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat dibasisches Dihydrat	30435-500G	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Normal Donkey Serum (NDS)	GTX3245-500	Biozol, Eching
Paraformaldehyd (PFA)	P6148-1KG	Merck, Darmstadt
Poly-L-Lysin	L7240	Biochrom GmbH, Berlin
Triton X-100	T9284-500ML	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tween-20	P7949-500ML	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Vectastain ABC-Elite Standard: HRP	PK-6100	Linaris Biologische Produkte GmbH, Dossenheim
Wasserstoffperoxid 30%	822287	Merck, Darmstadt
Xylol	1.08685.2500	Merck, Darmstadt

4.1.4 Ge- und Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Deckgläschen	24 x 60 mm, Nr. H878	Roth GmbH, Karlsruhe
Faltenfilter	604	Schleicher und Schuell GmbH, Dassel
Frischhaltefolie	handelsübliche	diverse
Immersionsöl	Type F	Olympus Corporation, Tokio, Japan
Lens Tissue	101 020	Dörr GmbH, Neu-Ulm
Nagellack	handelsüblicher	diverse
Objektträger	76 x 26 mm	Menzel GmbH und Co. KG, Braunschweig

Objektträgermappen	Für 20 Objektträger	LAT Labor- und Analysen-Technik GmbH, Garbsen
Pap-Pen	Z377821-1EA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
pH-Indikatorpapier	9533	Merck, Darmstadt
Pinself	Rotmarderhaar	Renensis, Flensburg
Rasierklinge	/	Wilkinson Sword, Solingen
Schnittboxen	/	MAGV GmbH, Rabenau

4.1.5 Primäre Antikörper

Antigen	Spezies, Typ	Verdünnung	Triton X	Nummer	Hersteller
7/4	Rat, monoclonal IgG	1:500	0,3 %	MCA771G	ABD Serotec, Puchheim
CD163	Rabbit polyclonal IgG	1:1000	0 %	Sc-33560	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, USA
COX2 (M-19)	Goat polyclonal IgG	1:2000	0,3 %	Sc-1747	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, USA
NF-IL6	Rabbit polyclonal IgG	1:5000	0,3 %	Sc-150 Lot: D0808	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, USA
POMC	Rabbit polyclonal IgG	1:2000	0,3 %	Geschenk von Dr. Blähser, Institut für Anatomie und Zytobiologie, JLU Gießen, (Blahser 1988)	
STAT3 (C-20)	Rabbit polyclonal IgG	1:3000	0,3 %	Sc-482	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, USA
VIPR1	Goat polyclonal IgG	1:500	0,3 %	Sc-15958	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, USA
vWF	Sheep polyclonal IgG	1:3000	0,3 %	SARTW-IG	Affinity Biologicals, Ancaster, Kanada
vWF	Rabbit polyclonal IgG	1:2000	0,3 %	A0082	DAKO Deutschland GmbH, Hamburg

4.1.6 Sekundäre Antikörper

Fluorochrom	Aus Spezies	Anti-Spezies	Verdünnung	Nummer	Hersteller
Alexa 488	donkey	rabbit	1:500	A21206	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA

Alexa 488	donkey	sheep	1:500	A11015	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Cy TM 3	donkey	rat	1:500	712-165-150	Jackson Immuno Research Europe Ltd., Newmarket, UK
Cy TM 3	donkey	goat	1:500	705-165-147	Jackson Immuno Research Europe Ltd., Newmarket, UK
Cy TM 3	donkey	rabbit	1:500	711-165-152	Jackson Immuno Research Europe Ltd., Newmarket, UK
biotinyliert	horse	goat	1:200	BA9500	Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA

4.2 Grundlagen der Methode

Die Immunfluoreszenz bzw. Immunhistochemie ist eine Methode um bestimmte Antigene in Gewebeschnitten zu detektieren. Das Prinzip dieser Methode basiert darauf, dass die gesuchten Antigene durch spezifische primäre Antikörper gebunden werden und diese Antigen-Antikörper-Komplexe im Anschluss sichtbar gemacht werden. Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind meist polyklonale Immunglobuline (Ig)G, d.h. es sind Gemische aus mehreren verschiedenen Antikörpern, deren Paratope an verschiedene Epitope auf dem gesuchten Antigen binden.

Eine Möglichkeit diese Antigen-Antikörper-Komplexe sichtbar zu machen, ist die indirekte Immunfluoreszenz (Coons und Kaplan 1950). Dabei bindet ein Fluorochromgekoppelter sekundärer Antikörper, an das für die Wirtsspezies spezifische Fc-Fragment des primären Antikörpers. Mit Hilfe eines Fluoreszenz-Mikroskops kann das Fluorochrom mit Licht einer bestimmten Wellenlänge (495 nm für Alexa488 bzw. 550 nm für Cy3) angeregt werden, woraufhin es ein längerwelliges Fluoreszenzlicht emittiert (siehe auch Abbildung II-11). Dieses Licht tritt durch einen speziellen Sperrfilter im Fluoreszenz-Mikroskop und wird dadurch sichtbar. Wenn zwei verschiedene Primär-Antikörper aus unterschiedlichen Wirtsspezies mit entsprechenden unterschiedlichen Fluorochromen verwendet werden, können mit dieser Methode auch zwei verschiedene Antigene gleichzeitig detektiert werden (Doppelmarkierung). Zusätzlich wurden in der vorliegenden Arbeit Zellkerne durch

eine Färbung mit DAPI sichtbar gemacht. DAPI bindet DNA. Dieser DNA-DAPI-Komplex wird durch Licht der Wellenlänge 358 nm angeregt.

Der Vorteil dieser Methode ist eine hohe Sensitivität der Antigen-Detektion. Ein Nachteil ist jedoch die geringe Haltbarkeit der Färbung, da das Fluorochrom innerhalb weniger Tage ausbleicht.

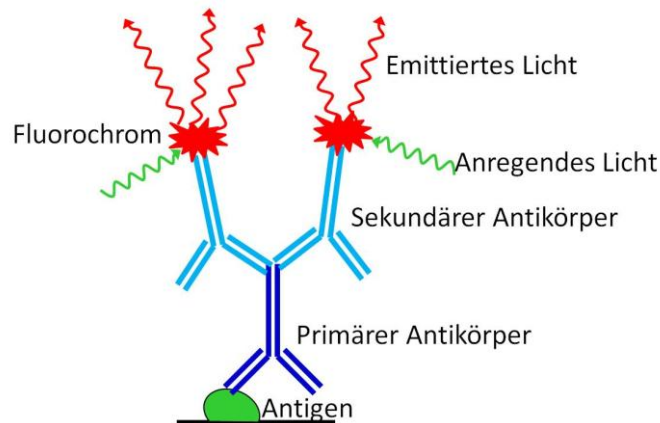


Abbildung II-11

Das Antigen im Gewebe wird spezifisch vom primären Antikörper gebunden. Ein Fluorochromgekoppelter sekundärer Antikörper bindet das Fc-Fragment des primären Antikörpers. Durch Licht einer bestimmten Wellenlänge wird das Fluorochrom angeregt und emittiert längerwelliges Licht.

Eine weitere Möglichkeit die Antigen-Antikörper-Komplexe sichtbar zu machen ist die DAB-Methode (Nakane und Pierce 1966). Bei dieser Methode wird ebenfalls ein gegen das Fc-Fragment der Wirtsspezies des primären Antikörpers gerichteter sekundärer Antikörper verwendet. Dieser ist jedoch biotinyliert. An dieses Biotin wird in einem weiteren Schritt eine Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt. Mit Hilfe von Wasserstoffperoxid als Oxidationsmittel kann diese Peroxidase DAB oxidieren, wobei ein brauner Niederschlag entsteht, der lichtmikroskopisch sichtbar ist. Auch bei dieser Methode ist eine Gegenfärbung der Kerne möglich, diese erfolgt mit dem Farbstoff Kresylviolett. Der Vorteil dieser Methode gegenüber der Immunfluoreszenz ist die deutlich längere Haltbarkeit der Färbung. Nachteil ist jedoch, dass eine Doppelmarkierung nicht möglich ist.

4.3 Herstellung von Gehirnschnitten am Kryostat

Die Gehirne und die Hypophysen wurden in einem Kryostat bei einer Box-Temperatur von -18 bis -20°C und einer Objekt-Temperatur von -13°C geschnitten. Zunächst wurde das Gehirn mit Hilfe von „tissue freezing medium“ auf den Objekthalter aufgefroren. Dabei wurde das Großhirn mit der caudalen, das Kleinhirn mit der rostralen Seite auf den Halter aufgebracht. Nach Ausrichtung des Gehirns senkrecht zur Messerklinge wurden 20 µm dicke coronale Schnitte des Gehirns angefertigt. Ein Atlas für coronale Gehirnschnitte der Maus (Paxinos 2001) diente der exakten Bestimmung der Schnittebene und Lage der zu untersuchenden Strukturen. Die Schnitte der zu untersuchenden Strukturen wurden auf vorgekühlte Poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger überführt und durch leichtes Erwärmen der Rückseite des Objektträgers mit einem Finger kurz getaut und fixiert. Die Poly-L-Lysin-Beschichtung bewirkte eine optimale Haftung der Schnitte am Objektträger (Mazia et al. 1975).

Beim Großhirn wurden jeweils mindestens 12 Schnitte aus den Regionen *organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT), *nucleus praeopticus medianus* (MnPO), *organum subfornicale* (SFO), *nucleus paraventricularis* (PVN), *nucleus arcuatus* (Arc) sowie der *eminentia mediana* (ME) gesammelt (*bregma* 0,62 mm bis *bregma* -2,3 mm). Die dazwischen liegenden Schnitte wurden auf einem weiteren Objektträger übereinander gestapelt. Mit einer vorgekühlten Skalpellklinge wurde dann der Hypothalamus, sowie die dorsal und lateral gelegenen Anteile des Cortex ausgeschnitten, in linke und rechte Hälften geteilt und in sterilen Eppendorf-Gefäßen bis zur weiteren Analyse mittels PCR und Western Blot bei -54°C gelagert. Die so erhaltenen Proben wogen jeweils etwa 15-20 mg.

Beim Kleinhirn und Stammhirn wurden Schnitte von der gesamten *area postrema* (AP, *bregma* -7,2 mm bis *bregma* -7,76 mm) gesammelt, bei der Hypophyse wurden, sofern möglich, Schnitte durch alle drei Lappen angefertigt.

Die fertigen Schnitte wurden in Schnittboxen bei -54°C gelagert.

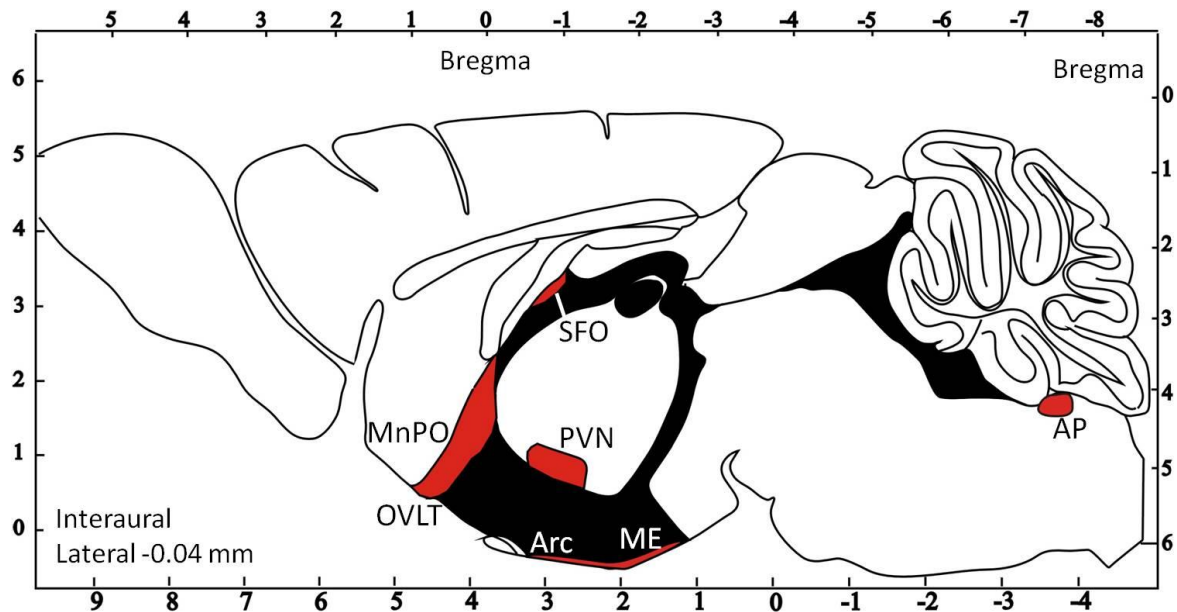


Abbildung II-12

Sagittal-Schnitt durch ein Maus-Gehirn: Die roten Strukturen kennzeichnen die in dieser Arbeit untersuchten Gehirnregionen; die Ventrikel sind in Schwarz dargestellt. OVLT = *organum vasculosum laminae terminalis*; MnPO = *nucleus praeopticus medianus*; SFO = *organum subfornicale*; PVN = *nucleus paraventricularis*; Arc = *nucleus arcuatus*; ME = *eminentia mediana*; AP = *area postrema*. Modifiziert nach (Paxinos 2001).

4.3.1 Spezifität der verwendeten Primär-Antikörper

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, um die Spezifität primärer Antikörper zu testen. Zum einen können Positiv- und Negativkontrollen durchgeführt werden. Als Positivkontrolle für NF-IL6 z. B. wurde der Hippocampus herangezogen, da dort unabhängig von der Behandlung der Tiere stets NF-IL6-Signale zu finden sind. Als Negativkontrolle dienten in diesem Fall Gehirnschnitte von NF-IL6-Knockout-Mäusen. Stehen die entsprechenden Knockout-Tiere nicht zur Verfügung, kann der primäre Antikörper zur Negativkontrolle auch mit einem Überschuss des von ihm zu bindenden Proteins (Immunogens) inkubiert werden. Dadurch werden spezifische Bindungsstellen des Antikörpers abgesättigt, bevor er in der Immunhistochemie eingesetzt wird. Bei einem spezifisch bindenden Antikörper sollten somit keine Signale mehr detektierbar sein. Unspezifische Kreuzreaktionen zwischen zwei gemeinsam eingesetzten Antikörpern können getestet werden, indem einer der Primär-Antikörper durch das Serum eines nicht-immunisierten Tieres der gleichen

Wirtsspezies ersetzt wird. Desweiteren kann überprüft werden, ob das durch den Antikörper markierte Protein im Western Blot das zu erwartende Molekulargewicht aufweist. Dies konnte ebenfalls in der vorliegenden Arbeit für NF-IL6 gezeigt werden.

Die Spezifität der verwendeten Antikörper wurde getestet, sofern nicht bereits entsprechende Daten aus vorherigen Studien vorlagen (Rummel et al. 2006; Rummel et al. 2008; Rummel et al. 2010; Damm et al. 2011; Fuchs et al. 2013).

4.4 Versuchsprotokoll

4.4.1 Immunfluoreszenz

Lösung	Zusammensetzung
Stock A	27,6 g Na_2HPO_4 in 1 l <i>Aqua bidest.</i>
Stock B	35,6 g NaH_2PO_4 in 1 l <i>Aqua bidest.</i>
PBS (pH = 7,4)	280 ml Stock A + 720 ml Stock B + 1 l <i>Aqua bidest.</i>
20 % PFA (Stocklösung)	Lösung von PFA (Pulver) in <i>Aqua bidest.</i> unter Rühren bei 60 °C; Zugabe weniger Tropfen Natronlauge zur Klärung der Lösung; Filtration und Abkühlen der Lösung
2 % PFA (Gebrauchslösung)	1:10 Verdünnung der 20 % PFA Stocklösung mit PBS
Blockungs-Lösung	10 % NDS + 0,3 % Triton X-100 (0 % für CD163) in PBS
DAPI-Lösung	Verdünnung von DAPI 1:8000 in PBS
PBST	0,05 % Tween-20 in PBS

Tabelle II-9

Herstellung der für die Immunfluoreszenz benötigten Lösungen.

Die bei -54 °C gelagerten Gehirnschnitte wurden zunächst im Kryostat auf -20 °C erwärmt. Anschließend erfolgten die Trocknung bei RT sowie die Umrandung mit Pap-Pen (Fettstift), um bei den späteren Inkubationen ein Herunterlaufen der Inkubationslösungen vom Objektträger zu verhindern. Die Fixierung des Gewebes in 2%igem PFA führte zu einer Vernetzung reaktiver Gruppen der im Gewebe vorhandenen Polypeptide. Durch diesen Vorgang wurden ebenfalls die Antigene stabilisiert. Durch die Inkubation mit „normal donkey serum“ wurden anschließend im Gewebe vorhandene unspezifische Bindungsstellen abgesättigt (Blockung). Das ebenfalls in der Blockungslösung vorhandene Triton X-100 (siehe Kapitel II.4.1.5)

bewirkte eine erhöhte Durchlässigkeit der Zellmembranen im Gewebe, so dass die Antikörper während der folgenden Inkubationen leichter in die Zellen eindringen konnten. Nach den Inkubationen mit den primären und den sekundären Antikörpern wurden die Zellkerne mit DAPI gegengefärbt und die Schnitte abschließend mit Citifluor gedeckelt. Alle Arbeitsschritte ab der Inkubation mit den Sekundär-Antikörpern wurden in einer möglichst lichtarmen Umgebung durchgeführt, um ein Ausbleichen der Fluorochrome zu minimieren. Die Färbung wurde nach dem Protokoll in Tabelle II-10 durchgeführt.

Arbeitsschritt	Vorgehen	Temperatur	Dauer
Schnitte aufwärmen	Im Kryostat	-20 °C	15 min
Trocknen	Mit Pap-Pen umrunden	RT	5-7 min
Fixieren	2 % PFA	RT	10 min
Waschen	PBS	RT	3 x 5 min
Blocken	Blockungslösung, feuchte Kammer	RT	60 min
1. Inkubation	Primär-Antikörper in Blockungslösung, feuchte Kammer	4 °C RT für 7/4-Antikörper	20-24 h
Waschen	PBS / PBST für 7/4-Antikörper	RT	3 x 5 min
2. Inkubation	Sekundär-Antikörper in Blockungs- lösung, feuchte Kammer, abgedunkelt	RT	2 h
Waschen	PBS, abgedunkelt	RT	3 x 5 min
3. Inkubation	DAPI-Lösung, abgedunkelt	RT	10 min
Waschen	PBS, abgedunkelt	RT	3 x 5 min
Deckeln	2 Tropfen Citifluor, Lagerung bei 4 °C		

Tabelle II-10

Arbeitsschritte bei der Immunfluoreszenz

4.4.2 Immunhistochemie (DAB-Methode)

Lösung	Zusammensetzung
DAB-Lösung	1 % DAB in PBS
Alkoholreihe	50 %, 70 %, 90 %, und 100% Ethanol in <i>Aqua bidest.</i>
ABC-Lösung	Lösung A und Lösung B jeweils 1:100 in PBS
Kresylviolett-Lösung	0,2 g Kresylviolett unter Erwärmen und Rühren in 200 ml <i>Aqua bidest.</i> lösen, abkühlen, 0,5 ml Essigsäure zugeben, filtrieren
10 % H ₂ O ₂	1:3 Verdünnung aus 30 % H ₂ O ₂ -Lösung mit <i>Aqua bidest.</i>

Tabelle II-11

Herstellung der für die Immunhistochemie verwendeten Lösungen.

Bei der Immunhistochemie mit der DAB-Methode sind die Schritte bis zur Inkubation mit dem ersten Antikörper identisch mit denen bei der Immunfluoreszenz. Der sekundäre Antikörper war hier jedoch nicht an ein Fluorochrom, sondern an Biotin gekoppelt. Durch Inkubation mit der ABC-Lösung (Vectastain ABC-Elite Standard) wurde an das Biotin eine Peroxidase gebunden. Mit DAB und Wasserstoffperoxid wurden der Peroxidase anschließend Substrate für eine Redox-Reaktion zur Verfügung gestellt. DAB wurde dadurch zu einem braunen, lichtmikroskopisch sichtbaren Niederschlag oxidiert. Eine anschließende Inkubation in Histoclear entfernte ungebundene DAB-Niederschläge und erhöhte den Kontrast zwischen Signalen und dem Hintergrund. In einer absteigenden Alkoholreihe wurden die Schnitte im nächsten Schnitt rehydratisiert, um eine Gegenfärbung der Kerne in der wässrigen Kresylviolett-Lösung zu ermöglichen. Nach erneuter Dehydratation in einer ansteigenden Alkoholreihe wurden die Präparate schließlich mit Entellan gedeckelt. Das genaue Protokoll ist in Tabelle II-12 beschrieben.

Arbeitsschritt	Vorgehen	Temperatur	Dauer
Schnitte aufwärmen	Im Kryostat	-20 °C	15 min
Trocknen	Mit Pap-Pen umrunden	RT	5-7 min
Fixieren	2 % PFA	RT	10 min
Waschen	PBS	RT	3 x 5 min
Blocken	Blockungslösung, feuchte Kammer	RT	60 min
1. Inkubation	Primär-Antikörper in Blockungslösung, feuchte Kammer	4 °C	44-48 h
Waschen	PBS	RT	3 x 5 min
2. Inkubation	Sekundär-Antikörper in Blockungslösung, feuchte Kammer	RT	60 min
Waschen	PBS	RT	3 x 5 min
3. Inkubation	ABC-Lösung, feuchte Kammer	RT	60 min
Waschen	PBS	RT	3 x 5 min
4. Inkubation	DAB-Lösung	RT	15 min
Farbreaktion	10 µl 10 % H ₂ O ₂	RT	4-6 min

5. Inkubation	Histoclear	RT	2 h
Rehydratation	Absteigende Alkoholreihe	RT	Je 2 min
Abspülen	<i>Aqua bidest.</i>	RT	2-3 sec
6. Inkubation	Kresylviolett	RT	30 sec
Dehydratation	Aufsteigende Alkoholreihe 50- 90 %	RT	30 sec
Dehydratation	100 % Ethanol	RT	2 min
7. Inkubation	Histoclear	RT	5 min
8. Inkubation	Xylol	RT	5 min
Deckeln	2-3 Tropfen Entellan	RT	

Tabelle II-12

Arbeitsschritte für die Immunhistochemie (DAB-Methode).

4.5 Mikroskopie

4.5.1 Immunfluoreszenz

Die Auswertung der Immunfluoreszenz erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops mit Objektiven für 10-, 20-, 40- und 100-fache Vergrößerungen. Als Lichtquelle diente hier eine Quecksilberdampf Lampe (BH2-RFL-T3), aus deren Licht durch verschiedene Filter die für die Anregung der Fluorochrome benötigten Wellenlängen herausgefiltert wurden. Cy3 wurde über ein U-MNIG-Filtermodul mit Licht der Wellenlänge 530-550 nm angeregt und emittierte daraufhin rotes Licht (Wellenlänge 630-660 nm), Alexa488 wurde über ein Breitband-FITC-(U-MWIBA)-Filtermodul mit Licht der Wellenlänge 460-490 nm angeregt, woraufhin es grünes Licht der Wellenlänge 510-540 nm emittierte. Ein Breitband-UV-Filtermodul (U-MWU, Wellenlänge 330-385 nm) wurde verwendet, um die mit DAPI gefärbten Zellkerne sichtbar zu machen, die daraufhin blaues Licht (Wellenlänge 461 nm) emittierten.

Mit einer an das Mikroskop angeschlossenen Visicam-12-Bit-schwarzweiss-Kamera wurden Fotos der zu untersuchenden Gehirnregionen angefertigt. Mit Hilfe des Programmes Metamorph wurden diese Bilder dann zu einem Mehrkanal-RGB-Bild zusammengefügt. Anschließend wurden die Bilder noch mit Adobe Photoshop bezüglich Helligkeit, Kontrast und Farbbalance angepasst. Bei diesen Vorgängen

wurden alle Schnitte einer Immunfluoreszenz auf die gleiche Weise behandelt, um die Vergleichbarkeit der Schnitte untereinander zu gewährleisten.

4.5.2 Immunhistochemie

Die Auswertung der Immunhistochemie erfolgte mit Hilfe eines Durchlichtmikroskops, ebenfalls mit Objektiven zur 10-, 20-, 40- und 100-fachen Vergrößerung. Mit einer an das Mikroskop angeschlossenen Digitalkamera (Camedia C-3030) wurden Farbfotografien von den zu untersuchenden Gehirnregionen angefertigt.

4.6 Auswertung und Statistik

Die Stärke und Anzahl der Signale wurde für jeden Schnitt semiquantitativ nach dem Schema in Tabelle II-13 ausgewertet.

Symbol	Bedeutung	Zahlenwert
+++	Viele, starke Signale	5
++	Einige, stärkere Signale	4
+	Wenig Signale	3
-/+	Einzelne, schwache Signale	2
-	Keine Signale	1

Tabelle II-13

Bewertungsstufen bei der semiquantitativen Auswertung der Signaldichte in der Immunfluoreszenz.

Für jedes Tier wurde pro Perfusionszeitpunkt (8 bzw. 24 h) der Mittelwert über alle ausgewerteten Schnitte einer Gehirnregion (mindestens 2) gebildet. Aus diesen Werten konnten weiterhin auch der Mittelwert sowie der Standardfehler für jede Tierversuchsgruppe berechnet werden. Der statistische Vergleich der Gruppen erfolgte dann durch das Programm GraphPad Prism mittels zwei-faktorieller ANOVA (Faktoren Behandlung und Genotyp) sowie Bonferroni *post-hoc* Test im Falle einer positiven Interaktion. Werte, die mehr als die 1,5-fache IQR unter dem 25%-Perzentil oder über dem 75%-Perzentil lagen, wurden als Ausreißer angesehen und aus der statistischen Auswertung entfernt.

5. Quantitative Real-Time PCR

5.1 Materialien

5.1.1 Technische Geräte

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Bandelin Sonoplus	HD2070	Bandelin electronic GmbH und Co. KG, Berlin
Beckman Spectrophotometer	UV-DU50	Beckmann Coulter GmbH, Krefeld
Photometer	Biophotometer Plus	Eppendorf AG, Hamburg
Schwingmühle	MM 301	Retsch GmbH, Haan
StepOne Plus	272001989	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Zentrifuge für 96-Well-Platten	Perfect Spin P	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen

5.1.2 Software

Bezeichnung	Hersteller
DataAssist	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
GeNorm Software	PrimerDesign Ltd, Southampton, UK
Normfinder	Department of Molecular Medicine, Universität Aarhus, Aarhus, Dänemark
StepOne Software v. 2.1	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA

5.1.3 Chemikalien

Bezeichnung	Katalog-Nummer	Hersteller
Chloroform	C2432-500ML	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Deoxynucleotide Mix (dNTPs)	D7295-.5ML	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Diethyl Pyrocarbonat (DEPC)	D5758-25ML	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DTT	Y00147	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Isopropanol	I9516-500ML	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
M-MLV Reverse Transcriptase	AM2044	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
NucleoSpin RNA XS	740902.50	Macherey-Nagel, Düren
Precision Master Mix with ROX	Precision-R	PrimerDesign Ltd, Southampton, UK
Primer Design PerfectProbe geNorm 12 gene kit mouse	Ge-DD-12-mo	PrimerDesign Ltd, Southampton, UK
Random Hexamer	R02964	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA

RNaseZap	R2020-250ML	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
RT-Puffer	Y02321	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Taqman Gene Expression Master Mix	4369016	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Trizol Reagent	15596-018	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA

5.1.4 Ge- und Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Gehörschutz	1440	3M, Saint Paul, MN, USA
Micro Amp 8-Cap Strip	N8010535	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Micro Amp 8-Tube Strip	N8010580	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Micro Amp 96-Well Support Base	N4379590	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Micro Amp Fast Optical 96-Well Reaction Plate	N4346907	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Micro Amp Optical Adhesive Film	N4311971	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Micro Amp Optical Adhesive Film Applicator	N4333183	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Präzisionsküvette aus Quarzglas Suprasil	105.202-QS	Hellma GmbH und Co. KG, Müllheim
Schutzbrille	/	Infield Safety GmbH, Solingen
UVetten (Einmal-Küvetten)	220-1600 nm	Eppendorf AG, Hamburg

5.1.5 Verwendete „Taqman gene expression Assays“ der Firma Life Technologies, Carlsbad, CA, USA

Gen	Assay-ID
CD163	Mm00474091_m1
CD68	Mm03047340_m1
COX2	Mm00478374_m1
CXCL1	Mm04207460_m1
GAPDH	4352339E-1009032
IDO	Mm00492586_m1
IL-10	Mm00439614_m1
IL1-ra	Mm00446186_m1
IL-1 β	Mm00434228_m1

IL-6	Mm00446190_m1
iNOS	Mm00440502_m1
I κ B α	Mm00477798_m1
KMO	Mm01321343_m1
miR155	Mm01716204_m1
mPGES	Mm00452105_m1
NF-IL6	Mm00843434_s1
PACAP	Mm00437433_m1
POMC	Mm00435874_m1
Slc6A4	Mm00439391_m1
SOCS3	Mm00545913_s1
TNF α	Mm00443258_m1
TPH2	Mm00557715_m1
Trib1	Mm00454875_m1
VIPR1	Mm00449214_m1

5.2 Grundlagen der Methode

Vorbereitend für die quantitative real-time PCR wurde zunächst die RNA aus den zu untersuchenden Gewebeproben extrahiert und mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben (Efstratiadis et al. 1976; Carothers et al. 1989). Durch dieses Verfahren ist eine Untersuchung der Expression bestimmter Zielgene auf mRNA-Ebene möglich.

Im Anschluss wurde eine real-time PCR durchgeführt. Die Grundlagen der PCR wurden bereits in Kapitel II.2.2.4.3 beschrieben. Der Vorteil der real-time PCR gegenüber der klassischen PCR ist, dass Amplifizierung und Detektion der gesuchten DNA-Sequenz zeitgleich erfolgen. Somit kann die Reaktionskinetik analysiert werden, wodurch eine Quantifizierung der gesuchten DNA-Sequenz möglich ist (Cardullo et al. 1988). In dieser Arbeit wurden dazu sogenannte Taqman-Sonden verwendet (Heid et al. 1996). Das sind kurze, einzelsträngige DNA-Sequenzen, die komplementär zu einer Sequenz am 5'-Ende des gesuchten Gens sind und einen Farbstoff (6-Carboxyfluorescein, FAM) sowie einen „Quencher“ tragen. Der Farbstoff FAM wird durch Licht der Wellenlänge 495 nm angeregt und emittiert daraufhin Licht der Wellenlänge 517 nm. Solange die Taqman-Sonde intakt ist und dadurch der Farbstoff und der „Quencher“ nahe beieinander lokalisiert sind, absorbiert der „Quencher“ das

vom Farbstoff emittierte Licht. Bindet die Sonde jedoch an die gesuchte Gensequenz und wird diese dann amplifiziert, löst die DNA-Polymerase den Farbstoff vom 5'-Ende der Sonde, während der Rest der Sonde sowie der „Quencher“ hydrolysiert werden. Durch die Trennung von Farbstoff und „Quencher“ wird das vom Farbstoff emittierte Licht nicht mehr vom „Quencher“ absorbiert sondern kann detektiert werden (siehe auch Abbildung II-13). Die Menge des detektierten Lichts mit der für den Farbstoff spezifischen Wellenlänge 517 nm ist also proportional zur Anzahl der während der PCR synthetisierten Genkopien. Da die Detektion des emittierten Lichts am Ende jeder Elongationsphase erfolgt, kann der Verlauf der PCR in Echtzeit verfolgt werden.

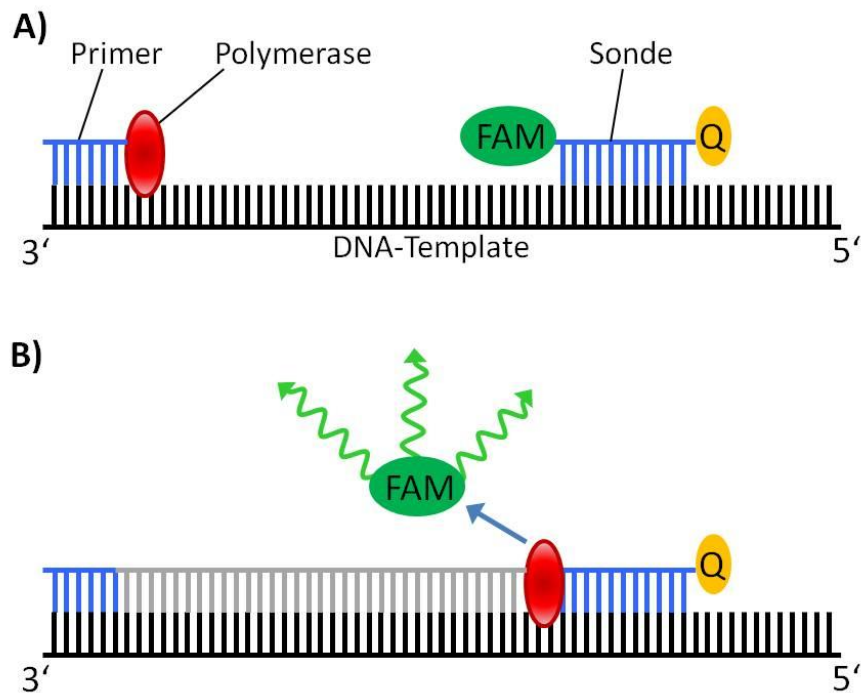


Abbildung II-13

A) Die Taqman-Sonde bindet spezifisch an die gesuchte Gensequenz. Die Sonde trägt einen Farbstoff (FAM) und einen „Quencher“ (Q), der das vom Farbstoff emittierte Licht absorbiert.
B) Während der Elongation wird der Farbstoff von der Sonde abgespalten während der Rest der Sonde mit dem „Quencher“ hydrolysiert wird. Durch die Trennung des Farbstoffs vom „Quencher“ kann der Farbstoff nun Licht emittieren. Modifiziert nach Seminarunterlagen „qPCR Gene Expression Training From Sample to C_T“ Life technologies, Carlsbad, CA, USA

5.3 RNA-Extraktion

5.3.1 *Hypothalamus, Cortex und Leber*

Die RNA-Extraktion aus Leber- und Gehirngewebe erfolgte mit der Trizol-Methode, einer single-step RNA-Extraktionsmethode (Chomczynski und Sacchi 1987), die eine hohe Ausbeute an RNA ermöglicht. Vorbereitend wurde DEPC-Wasser hergestellt, indem 1 ml Diethylpyrocarbonat (DEPC) in 1 l *Aqua bidest.* 24 h unter Rühren inkubiert wurde. DEPC bildet hierbei kovalente Bindungen zu primären und sekundären Aminen aus und inaktiviert so RNasen. Durch anschließendes Autoklavieren zerfällt das DEPC in CO₂ und Ethanol (Jones et al. 2001). Des Weiteren wurden alle Arbeitsflächen und alle benötigten Geräte mit 70% Ethanol, RNase ZAP und anschließend wieder mit 70% Ethanol gereinigt, um eine Kontamination der extrahierten RNA mit RNasen zu verhindern.

Zunächst wurde die gefrorene Gewebeprobe in eiskalter Trizol-Lösung mit einem Ultraschallhomogenisator zerkleinert. Der Ultraschall diente der groben Lösung des Gewebeverbandes. Trizol ist eine Lösung aus Phenol und Guanidin-Isothiocyanat. Phenol bewirkt eine Senkung des pHs und löst DNA-Fragmente. Guanidin-Isothiocyanat denaturiert Proteine. Durch anschließende Zentrifugation können große Moleküle wie Polysaccharide oder große DNA-Fragmente (Bodensatz) und Fette (schwimmen auf der Oberfläche) von der Lösung abgetrennt werden. Durch Inkubation bei Raumtemperatur wird gewährleistet, dass Nucleoproteine durch Guanidin-Isothiocyanat getrennt werden. Durch Zugabe von Chloroform wurden anschließend denaturierte Proteine und DNA-Fragmente gelöst. Nach erneuter Zentrifugation konnte anschließend die klare, RNA-haltige Phase des Gemischs entnommen werden, während die rote, Protein- und DNA-haltige Phase verworfen wurde. Durch Zugabe von Isopropanol und Inkubation bei -20°C wurde die RNA anschließend ausgefällt und durch erneute Zentrifugation zu einem Pellet geformt. Waschschrte mit Ethanol dienten anschließend der Entfernung von Isopropanol und anderen Rückständen. Abschließend wurde das RNA-Pellet in DEPC-Wasser gelöst (siehe auch Tabelle II-14).

Arbeitsschritt	Vorgehen	Dauer
Homogenisieren	500 µl eiskalte Trizol-Lösung zugeben Ultraschallhomogenisation	15 s
Ultraschallkopf waschen	Je einmal in Ethanol und einmal in DEPC-Wasser eintauschen	Je 5 s
Zentrifugation	12000 x g, 4 °C	10 min
Überstand abnehmen	In neues Gefäß überführen	
Trennung von Nucleoproteinen	Inkubation bei RT	5 min
Chloroform zugeben	100 µl, kräftig schütteln	15 s
Separation	Inkubation bei RT	3 min
Zentrifugation	12000 x g, 4 °C	20 min
In Isopropanol überführen	Klare Phase (mit RNA) in 250 µl Isopropanol überführen, vortexen	
Ausfällen	Bei -20 °C	Ca. 20 h
Zentrifugation	15000 x g, 4 °C	15 min
Pellet sichern	Überstand abgießen, kurz antrocknen lassen	
Waschen	1 ml 70% Ethanol zugeben, vortexen	
Zentrifugation	15000 x g, 4 °C Überstand abgießen, kurz antrocknen lassen	10 min
Waschen	1 ml 100% Ethanol zugeben, vortexen	
Zentrifugation	15000 x g, 4 °C Überstand abgießen	10 min
Trocknen	Pellet trocknen lassen	20-25 min
Lösen	In DEPC-Wasser Sehr kleines Pellet: 20 µl; mittleres Pellet: 50 µl vortexen	

Tabelle II-14

Arbeitsschritte bei der RNA-Extraktion aus Gehirn- oder Leber-Gewebe

Zur Quantifizierung des RNA-Gehalts in der so erhaltenen Lösung wurde eine 1:20 (Gehirn) bzw. 1:100 (Leber) Verdünnung der RNA-Lösung in *Aqua dest.* hergestellt. Im Photometer wurde anschließend die optische Dichte (OD) dieser Messlösung bei 260 nm bestimmt. Aus diesen Werten konnte die Konzentration der RNA-Lösungen ermittelt werden. Die RNA-Proben wurden anschließend auf eine Konzentration von

250 ng/μl verdünnt und bis zur reversen Transkription am nächsten Tag bei -54 °C gelagert.

Messgröße	Gleichung
RNA-Konzentration der Messlösung	$c(\text{RNA}_M) = \text{OD}_{260} \times 40 \text{ μg/ml}$
RNA-Konzentration der RNA-Lösung	$c(\text{RNA}_L) = c(\text{RNA}_M) \times 20 \text{ (Gehirn) bzw. } 100 \text{ (Leber)}$
Zugabe von DEPC-Wasser zum Einstellen der Konzentration auf 250 ng/μl	$V_{\text{DEPC}} = V_{\text{Probe}} \times c(\text{RNA}_L) / 250 - V_{\text{Probe}}$ $V_{\text{Probe}} = \text{restliches Probenvolumen}$

Tabelle II-15

Berechnung der RNA-Konzentration und der Benötigten Menge DEPC-Wasser zur Einstellung der RNA-Konzentration auf 250 ng/μl.

5.3.2 Hypophysen

Da die Hypophysen der Mäuse nur eine Masse von etwa 1 bis 1,5 mg hatten, wurde die RNA der Hypophysen mit dem Macherey-Nagel NucleoSpin RNA XS Extraktionskit extrahiert. Die Funktionsweise dieses Kits beruht auf den gleichen Prinzipien, wie die DNA-Extraktionskits (siehe Kapitel II.2.2.4.2). Das Protokoll der Extraktion ist in Tabelle II-16 dargestellt. Anschließend wurde auch hier die OD_{260} einer 1:50 verdünnten Messlösung mit Hilfe eines Photometers bestimmt und die Konzentration der Proben auf 50 ng/μl eingestellt.

Arbeitsschritt	Vorgehen	Dauer
Homogenisation	200 μl Buffer RA1 + 4 μl TCEP zu den gefrorenen Proben geben, in Schwingmühle bei 30 Hz zerkleinern	2 min
Carrier RNA working solution herstellen	1 μl Carrier RNA + 99 μl Buffer RA1	
Carrier RNA zugeben	5 μl Carrier RNA working solution zugeben, vortexen	10 s
Zentrifugation	1000 x g	1 s
Filtrieren	Mischung auf NucleoSpin Filter laden Zentrifugation 11000 x g, Filter werfen	30 s
Milieu für RNA-Bindung optimieren	200 μl 70% Ethanol zugeben, mischen	
Silica-Membran beladen	Auf NucleoSpin RNA XS Column laden Zentrifugation 11000 x g, Durchfluss werfen	30 s

Silica-Membran entsalzen	100 µl Membrane Desalting Buffer Zentrifugation 10000 x g	30 s
DNA verdauen	2,5 µl rDNase + 22,5 µl Reaction Buffer for rDNase zugeben, Inkubation bei RT	15 min
Waschen	100 µl Buffer RA2, Inkubation bei RT	2 min
Zentrifugation	11000 x g, Durchfluss verwerfen	30s
Waschen	400 µl Buffer RA3	
Zentrifugation	11000 x g, Durchfluss verwerfen	30s
Waschen	200 µl Buffer RA3	
Zentrifugation	11000 x g, Durchfluss verwerfen	2 min
Lösen der RNA	10 µl RNase-freies Wasser Zentrifugation 11000 x g	30 s

Tabelle II-16

**Protokoll der RNA-Extraktion aus Hypophysen mit dem NucleoSpin RNA XS Extraktionskit
von Macherey-Nagel, Düren**

5.4 Reverse Transkription

Die gewonnene mRNA wurde anschließend in cDNA umgeschrieben. Eine kurzzeitige Erhitzung auf 65 °C diente der Auflösung von Sekundär-Strukturen der mRNA. Unterstützt wurde dies noch durch Zugabe von Dithiothreitol (DTT). Als Startpunkt für die RNA-abhängige DNA-Polymerase (aus dem murinen Leukämievirus) wurden random Hexamer-Primer verwendet. Ein anschließendes Erhitzen auf 90 °C deaktivierte die Polymerase.

Mix 1	
5 µl	DEPC-Wasser
1 µl	Random Hexamer
1 µl	dNTPs
7 µl Mix 1 + 4 µl Probe in jedes Well	
Blank 1: 7 µl Mix + 4 µl DEPC-Wasser	
1) 65 °C für 10 min	
2) 4 °C	
Mix 2	
4 µl	RT Puffer
2 µl	Steriles Wasser

2 µl	0,1 M DTT
1 µl	RT-Enzym (M-MLV RT)
9 µl Mix 2 zu jeder Probe zugeben	
Blank 2: 9 µl Mix 2 + 11 µl DEPC-Wasser	
1) 37 °C für 60 min	
2) 90 °C für 5 min	
3) 4 °C	

Tabelle II-17

Protokoll der reversen Transkription

5.5 Durchführung der quantitativen Real-Time PCR

Die real-time PCR wurde nach dem Protokoll in Tabelle II-18 durchgeführt. Dabei wurden alle Proben in Duplikaten analysiert. Außerdem wurden beide Blanks aus der reversen Transkription sowie ein weiteres Blank mit 1 µl autoklaviertem Wasser anstatt der cDNA-Probe als Kontrolle auf DNA-Verunreinigungen analysiert.

PCR-Mix		
Autoklaviertes Wasser	3,5 µl	
Gene Expression Master Mix	5 µl	
Primer	0,5 µl	
9 µl PCR-Mix + 1 µl cDNA in jedes Well		
Thermocycler-Protokoll		
50 °C (Aktivierung der Polymerase)	2 min	
95 °C (Denaturierung)	10 min	
95 °C (Denaturierung)	15 s	40 Zyklen
60 °C (Annealing, Elongation)	60 s	

Tabelle II-18

Protokoll der quantitativen real-time PCR

5.6 Ermittlung der optimalen endogenen Kontrolle mit Hilfe des Primer Design „Reference Gene Kits“

Eine endogene Kontrolle ist ein Gen, das in den vorliegenden Proben ohne Einfluss durch die Behandlung oder den Genotyp möglichst konstant exprimiert wird. Es dient der Normalisierung der Proben um eventuelle Unterschiede in der Menge der in die PCR eingesetzten cDNA auszugleichen (Boda et al. 2009).

Zur Ermittlung der besten endogenen Kontrolle für die PCR wurden 12 häufig bei der Maus als Kontrolle verwendete Gene getestet. Dazu wurde die Expression dieser Gene in jeweils 3 Proben jeder experimentellen Gruppe analysiert. Anschließend wurden diese Daten mit Hilfe der Programme GeNorm Software, NormFinder und DataAssist ausgewertet. Alle drei Programme ermittelten GAPDH und ATP5B als die beiden Gene mit der stabilsten Expression. Das Programm Normfinder analysierte außerdem noch, welches Gen mit der geringsten Schwankung zwischen und innerhalb der experimentellen Gruppen exprimiert wurde, wobei GAPDH etwas besser abschnitt als ATP5B, weswegen GAPDH als endogene Kontrolle für die real-time PCR gewählt wurde.

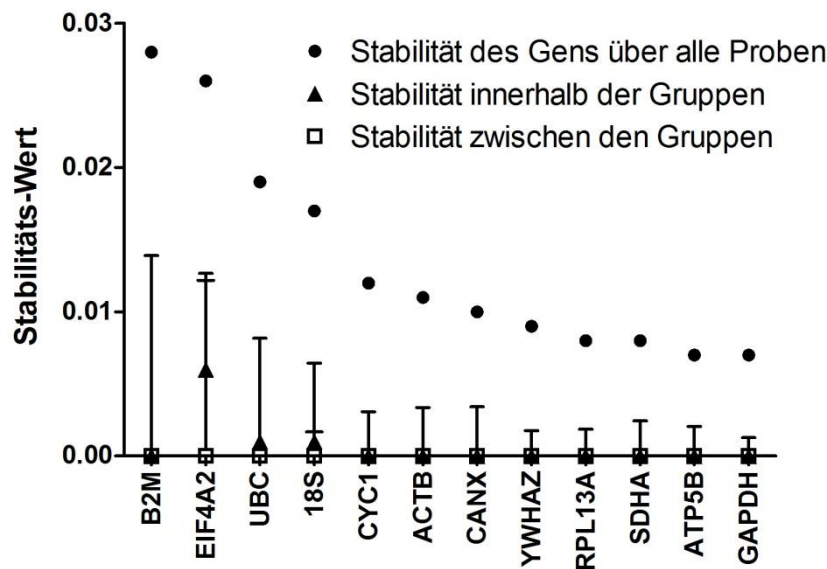


Abbildung II-14

Stabilität der Expression verschiedener getesteter potentieller endogener Kontrollen. Je kleiner der Stabilitäts-Wert, desto größer die Stabilität des Gens.

5.7 Auswertung und Statistik

Für die Auswertung der Expression der verschiedenen Zielgene wurde die Delta- C_T -Methode verwendet (Livak und Schmittgen 2001). Der C_T -Wert beschreibt den Zyklus der PCR, in dem ein Signal erstmalig einen gewissen Schwellenwert überschreitet. Dies geschieht in der exponentiellen Phase der Amplifikation (siehe auch Abbildung II-6). Alle Proben wurden im doppelten Ansatz gemessen, deswegen wurden die C_T -

Werte aus beiden Ansätzen zunächst gemittelt. Anschließend wurde für jede Probe die Differenz zwischen dem C_T -Wert des Zielgens und dem C_T -Wert der endogenen Kontrolle gebildet (ΔC_T). Daraufhin wurde die Differenz zwischen ΔC_T der Proben und ΔC_T einer Referenzprobe gebildet ($\Delta\Delta C_T$). Zu guter Letzt wurde mit der Formel $2^{-\Delta\Delta C_T}$ die x-fache Expression (relative Expression) jeder Probe gegenüber der Referenzprobe berechnet. Voraussetzung für diese Berechnung war jedoch eine 100%ige Effizienz der PCR, das heißt eine Verdopplung der Genkopien in jedem Zyklus. Bei den verwendeten Primern und unter Verwendung der Originalprodukte garantiert der Hersteller Life Technologies eine optimale Effizienz der PCR (Angaben des Herstellers).

Die so errechneten Werte für die relative Expression wurden anschließend für den 8- und den 24-h-Perfusionszeitpunkt getrennt mit einer zwei-faktoriellen ANOVA sowie einem Bonferroni *post-hoc* Test analysiert (siehe auch Kapitel II.4.6).

6. Zytokin-Bioassays

6.1 Materialien

6.1.1 Technische Geräte

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Brutschrank	Nuaire-US-Autoflow	Nuaire, Plymouth, MN, USA
ELISA-Reader	Digiscan	Asys Hitech, Eugendorf, Österreich

6.1.2 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl] 2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid (MTT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Actinomycin D	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Fetales Kälberserum	Life technologies, Carlsbad, CA, USA
Gentamicin	Life technologies, Carlsbad, CA, USA
Glutamin	Life technologies, Carlsbad, CA, USA
Heparin-Natrium-25000-ratiopharm	Ratiopharm GmbH, Ulm

IL-6 Standard	National Institute for Biological Standards and Control, Potters Bar, UK
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Mercaptoethanol	Life technologies, Carsbad, CA, USA
Penicillin-Streptomycin (5000 IU/ml)	Life technologies, Carsbad, CA, USA
RMPI-Medium	Life technologies, Carsbad, CA, USA
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
TNF-Standard	National Institute for Biological Standards and Control, Potters Bar, UK
Trypsin (25%)	Biochrom, Berlin

6.1.3 Ge- und Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Gewebekulturflasche	Steril mit Filter, 50 / 75 / 250 / 550 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Gewebekulturplatte	Steril, mit Abdeckplatte, 96K	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zählkammer	Nach Neubauer	Labtech International Ltd., Uckfield, UK

6.2 Grundlagen der Methode

Mit Hilfe der Zytokin-Bioassays sollten die Mengen an biologisch aktivem IL-6 und TNF α im Blutplasma der Mäuse bestimmt werden. Die dabei verwendeten Verfahren sind bereits seit einigen Jahren am Institut für Veterinär-Physiologie und –Biochemie etabliert (Harre et al. 2002; Damm et al. 2011; Welsch et al. 2012; Fuchs et al. 2013).

Die Messung der Zytokine beruht darauf, dass bestimmte Zytokine bei bestimmten Zellen biologische Reaktionen hervorrufen. TNF α wirkt zytotoxisch auf Zellen der murinen Fibrosarkoma-Zelllinie (WEHI 164 Subklon 13) (Espevik und Nissen-Meyer 1986), IL-6 stimuliert das Wachstum von B9-Hybridoma-Zellen (Lansdorp et al. 1986). Die Menge des entsprechenden Zytokins korreliert also direkt mit der Anzahl der vitalen Zellen und damit mit deren biologischer Aktivität. Diese konnte mit Hilfe einer Farbreaktion bestimmt werden: Lebende Zellen setzen gelbes 3-[4,5-Dimethylthiazol-2yl]-2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid (MTT) zu blauen MTT-Formazan-Kristallen um (Mosmann 1983). Nach Auflösen der Zellen mittels HCl-

Isopropanol-Lösung konnte dann mit einem ELISA-Reader die OD bei 550 nm gemessen werden. Die Detektionsgrenzen dieser Methode liegen bei 3 IU IL-6 /ml und 6 pg TNF α /ml (Ross et al. 2003). Die Zytokin-Bioassays wurden von Jolanta Murgott durchgeführt.

6.3 IL-6

Die B9-Hybridoma-Zellen für die Messung von IL-6 wurden zunächst in einem speziellen Wachstumsmedium unter Zusatz von 500 IU IL-6-Standard bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit im Brutschrank kultiviert. Alle 3 Tage wurde 1 ml der Zellsuspension zusammen mit 9 ml frischem Wachstumsmedium in eine neue, sterile Zellkulturflasche passagiert.

Lösung	Zusammensetzung
Assay-Medium (IL-6)	45 ml RMPI Medium 4 ml Fetales Kälberserum 0,5 ml Glutamin (200 nM) 125 μ l Mercaptoethanol (200 nM) 65 μ l Gentamicin (10 ng/ml)
Assay-Medium (TNF α)	500 ml RMPI Medium 55 ml Fetales Kälberserum 5 ml Penicillin-Streptomycin 5 ml Glutamin (200 nM)
Wachstumsmedium	Assay-Medium 500 IU IL-6 Standard / ml
Isopropanol-HCl-Lösung	4 ml 2N HCl 196 ml Isopropanol
MTT-Lösung	0,1 g MTT 20 ml PBS

Tabelle II-19

Für das IL-6- und TNF α -Bioassay verwendete Lösungen

Das Assay wurde in einer 96-Well-Mikrotiterplatte durchgeführt. Das erste Well der Platte blieb dabei als „Blank“ leer. In den Wells B1 bis K1 wurde eine Verdünnungsreihe der IL-6-Standards angelegt, L1 enthielt nur das Assay-Medium. In der zweiten und dritten Zeile der Platte wurden Qualitätskontrollen mit bekannter IL-

6-Konzentration gemessen, in den restlichen Reihen die Proben. Die Messung erfolgte im doppelten Ansatz. Die unverdünnten Proben bzw. Qualitätskontrollen wurden in die ersten beiden Wells jeder Zeile gegeben. Anschließend wurde auch hier eine Verdünnungsreihe angelegt, indem die Proben 1:2 verdünnt ins jeweils übernächste Well der Zeile gegeben wurden. In jedes Well wurde dabei ein Gesamtvolumen von 100 µl gegeben.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	blank	S1 100 IU	S2 50 IU	S3 25 IU	S4 12,5 IU	S5 6,25 IU	S6 3,13 IU	S7 1,56 IU	S8 0,78 IU	S9 0,39 IU	S10 0,19 IU	Medium
2	QK 1	QK 1	1:2	1:2	1:4	1:4	1:8	1:8	1:16	1:16	1:32	1:32
3	QK 2	QK 2	1:2	1:2	1:4	1:4	1:8	1:8	1:16	1:16	1:32	1:32
4	P 1	P 1	1:2	1:2	1:4	1:4	1:8	1:8	1:16	1:16	1:32	1:32
5	P 2	P 2	1:2	1:2	1:4	1:4	1:8	1:8	1:16	1:16	1:32	1:32
6	P 3	P 3	1:2	1:2	1:4	1:4	1:8	1:8	1:16	1:16	1:32	1:32
7	P 4	P 4	1:2	1:2	1:4	1:4	1:8	1:8	1:16	1:16	1:32	1:32
8	P 5	P 5	1:2	1:2	1:4	1:4	1:8	1:8	1:16	1:16	1:32	1:32

Abbildung II-15

Beschickung der 96-Well-Mikrotiterplatte für das IL-6-Bioassay. S = Standard; QK = Qualitätskontrolle; P = Probe

Die Zellsuspension wurde dreimal für je 10 min bei 2300 rpm zentrifugiert und in Assay-Medium resuspendiert. Die in dieser Suspension vorliegende Zellzahl wurde anschließend mit Hilfe einer Zählkammer nach Thoma bestimmt und die Zellsuspension auf 5000 Zellen / 100 µl verdünnt. 100 µl dieser Zellsuspension wurden anschließend in jedes Well der Mikrotiterplatte gegeben und diese für 72 h im Brutschrank inkubiert. Danach wurden 25 µl MTT zu jedem Well hinzugefügt und die Platte nochmals 4 h inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurden 125 µl der

Flüssigkeit jedes Wells mit 100 µl des Isopropanol-HCl-Gemischs versetzt, wodurch die Zellen aufgelöst und der aus dem MTT gebildete Farbstoff freigesetzt wurden. Nach 12 h lichtgeschützter Inkubation bei RT erfolgte die Messung der OD mit Hilfe eines ELISA-Readers bei 550 nm.

6.4 TNF α

Zur Messung des TNF α wurde ein ähnliches Assay verwendet, jedoch wurden hier die Zellen durch das TNF α getötet. Aufgrund des adhärenenten Wachstums der WEHI-Zelllinie wurde hier zum Passagieren der Zellen das Medium dekantiert, die Zellen mit 25 %igem Trypsin vom Boden der Zellkulturflaschen abgelöst und in neue Flaschen mit frischem Medium überführt. Durch Enzyme des fetalen Kälberserums wurde das Trypsin inhibiert, so dass die Zellen bei Inkubation im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchte weiter wachsen konnten. Zur Anwendung im Assay wurde die Zellsuspension auf 50.000 Zellen / 100 µl eingestellt und mit 4 µg Actinomycin D / ml versetzt. Dies diente der Wachstumshemmung der Zellen sowie der Sensibilisierung gegenüber TNF α . Die Verdünnungsreihe der TNF-Standards begann mit einer Konzentration von 1000 pg/ml, ansonsten wurde das Assay analog zum IL-6-Assay durchgeführt.

6.5 Auswertung und Statistik

Anhand der Verdünnungsreihe der Standards wurde zunächst eine Eichkurve mit den Zytokin-Konzentrationen in logarithmischer Skalierung auf der x-Achse und der gemessenen OD auf der y-Achse erstellt. Diese Eichkurve verlief charakteristischerweise in einem begrenzten Bereich linear, d.h. die Menge des in der Probe vorhandenen Zytokins war proportional (IL-6) bzw. antiproportional (TNF α) zur Anzahl der vitalen Zellen und damit zur Menge der vorhandenen Formazan-Kristalle, die anhand der OD gemessen wurde. Es wurden nur die Proben ausgewertet, deren OD in diesem linearen Bereich lag. Alle anderen Proben wurden ggf. mit einer angepassten Verdünnung wiederholt. Mit Hilfe der Regressionsgleichung der Eichkurve sowie des Verdünnungsfaktors konnte so die Zytokin-Menge bestimmt werden.

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte auch hier durch eine zwei-faktorielle ANOVA (siehe auch Kapitel II.4.6).

7. ELISA

7.1 Materialien

7.1.1 Technische Geräte

Bezeichnung	Typ	Hersteller
ELISA-Reader	iEMS Reader MF	MTX Labsystems Inc., Vienna, VA, USA

7.1.2 Ge- und Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Corticosterone ELISA	EIA-4164	DRG Instruments GmbH, Marburg
IL-10 (mouse) ELISA	EIA-5683	DRG Instruments GmbH, Marburg

7.2 Grundlagen der Methode

Das Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) ist ein Verfahren zum Nachweis verschiedener Substanzen (hier Corticosteron und IL-10) in einer Probe, wie z. B. Blutserum. Die Methode basiert auf der Bindung des gesuchten Moleküls durch spezifische Antikörper, was durch einen enzymatisch-bedingten Farbumschlag angezeigt wird (Engvall und Perlmann 1971; Van Weemen und Schuurs 1971).

Grundlage des Tests ist eine 96-Well-Mikrotiterplatte, deren Wells mit einem polyklonalen Antikörper gegen die zu detektierende Substanz beschichtet sind. Ist die gesuchte Substanz in einer Probe enthalten, bindet sie an diese Antikörper. Beim Sandwich-ELISA (hier IL-10-ELISA) wird dann ein biotinylierter Antikörper gegen die zu detektierende Substanz zugegeben. Dieser bindet ebenfalls an das gesuchte Molekül und wird dann in einem nächsten Schritt an eine Straptavidin-Meerrettich-Peroxidase gekoppelt. Je mehr von dem gesuchten Molekül in einer Probe vorhanden ist, desto mehr HRP wird also gebunden. Beim kompetitiven Immunassay (hier Corticosteron-ELISA) wird hingegen ein Kompetitor-Antigen, an das eine HRP gekoppelt ist, eingesetzt. Dieses konkurriert mit dem gesuchten Molekül um die Bindungsstellen auf den Antikörpern. Hier gilt also: Je mehr von der gesuchten

Substanz in einer Probe ist, desto weniger HRP wird gebunden. Durch anschließende Zugabe von Tetramethyl-Benzidin (TMB) wird eine Farbreaktion gestartet, bei der ein blaues Produkt entsteht (Martin et al. 1984). Stoppt man die Reaktion nach einer definierten Zeit, gibt die Menge des gebildeten blauen Farbstoffes (OD bei 450 nm) Aufschluss über die Menge der vorhandenen HRP bzw. der zu detektierenden Substanz.

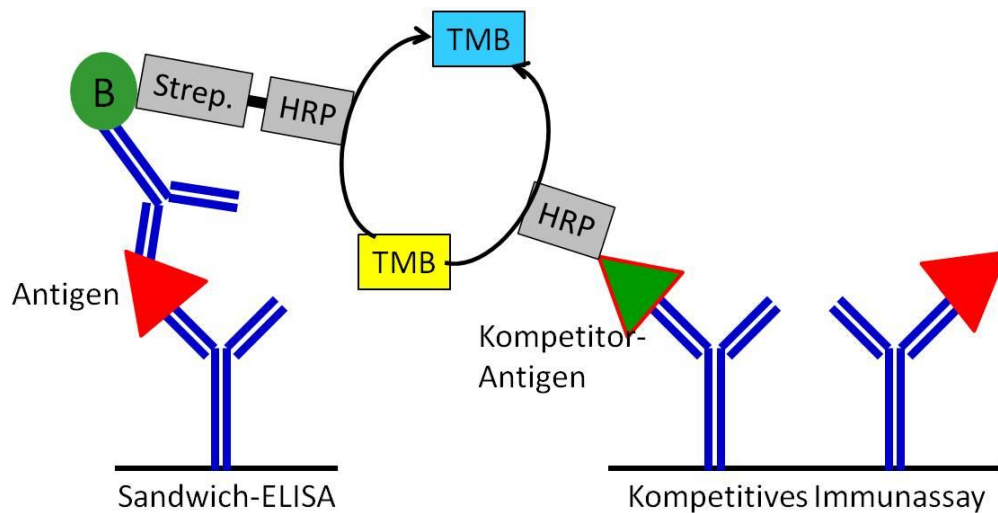


Abbildung II-16

Funktionsprinzip der beiden verwendeten Arten ELISA. B = Biotin; Strep. = Streptavidin; HRP = Meerrettich-Peroxidase; TMB = Tetramethyl-Benzidin

7.3 IL-10

Das IL-10-ELISA wurde wie in Tabelle II-20 beschrieben durchgeführt. Als Kontrolle dienten dabei zwei „Blank“-Wells, die lediglich den Puffer, jedoch keine Probe enthielten. Des Weiteren wurde eine Verdünnungsreihe mit IL-10-Standards hergestellt (beginnend bei 1000 pg/ml in 7 Schritten jeweils 1:2 verdünnt). Die Proben sowie die Standards wurden in doppelten Ansätzen bestimmt. Das Detektionslimit dieser Methode lag unter Berücksichtigung der Probenverdünnung bei 10-2000 pg/ml.

Arbeitsschritt	Durchführung (pro Well)	Dauer
2 x Waschen	2 x 400 µl Wash Buffer	2 x 15 s
Platte beschicken	50 µl Sample Diluent + 50 µl Probe (Blanks: 100 µl Sample Diluent)	
Inkubation	Auf Schüttler, RT	2 h

4 x Waschen	4 x 400 µl Wash Buffer	4 x 15 s
Biotinylierter Antikörper	100 µl Biotin-Conjugate	
Inkubation	Auf Schüttler, RT	1 h
4 x Waschen	4 x 400 µl Wash Buffer	4 x 15 s
Straptavidin-HRP	100 µl	
Inkubation	Auf Schüttler, RT	1 h
4 x Waschen	4 x 400 µl Wash Buffer	4 x 15 s
Farbreaktion	100 µl TMB Substrate Solution	10 min
Reaktion stoppen	100 µl Stop Solution	
Messung	OD bei 450 nm	

Tabelle II-20

Arbeitsschritte des IL-10-ELISA

7.4 Corticosteron

Das Corticosteron-ELISA wurde wie in Tabelle II-21 beschrieben durchgeführt. Es wurde eine Standard-Verdünnungsreihe verwendet (Konzentrationen 0 bis 240 nmol/l). Außerdem wurden zwei Kontrollen mit bekannter Corticosteron-Konzentration gemessen. Die Plasma-Proben wurden 1:2 (Kontrollen und LPS 24h-Tiere) bzw. 1:5 (LPS 8h-Tiere) vorverdünnt. Alle Proben, Standards und Kontrollen wurden in Duplikaten gemessen. Die Detektionsgrenzen des Assays waren unter Berücksichtigung der Probenverdünnung 1,13-415,75 ng/ml.

Arbeitsschritt	Durchführung (pro Well)	Dauer
Platte beschicken	20 µl Probe / Standard / Kontrolle	
Kompetitor-Antigen	200 µl Enzyme Conjugate	
Inkubation	Bei RT	1 h
3 x waschen	3 x mit Waschlösung	3 x 15 s
Farbreaktion	100 µl Substrate Solution	15 min
Reaktion stoppen	50 µl Stop Solution	
Messen	OD bei 450 nm	

Tabelle II-21

Arbeitsschritte des Corticosteron-ELISA

7.5 Auswertung und Statistik

Anhand der Verdünnungsreihen der Standards konnte für jedes Assay eine Standard-Kurve erstellt werden, mit deren Hilfe der Corticosteron- bzw. IL-10-Gehalt der Proben ermittelt werden konnte. Die so erhaltenen Daten wurden für den 8- und den 24-h-Zeitpunkt getrennt mit Hilfe einer zwei-faktoriellen ANOVA ausgewertet (siehe auch Kapitel II.4.6).

8. Western Blot

8.1 Materialien

8.1.1 Technische Geräte

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Bullet Blender	24	Next Advance Inc., Averill Park, NY, USA
Photometer	UV-1202	Shimadzu Europa GmbH, Duisburg
Western Blot-System	Mini-Protean Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
Zentrifuge	5415C	Eppendorf AG, Hamburg

8.1.2 Chemikalien

Bezeichnung	Katalog-Nummer	Hersteller
Acrylamide 30%	3029.1	Roth GmbH, Karlsruhe
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	9592.3	Roth GmbH, Karlsruhe
Bradford Reagent	B6916	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Bromphenolblau	A512.1	Roth GmbH, Karlsruhe
Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets	04693159001	Roche Holding GmbH, Grenzach-Whylen
Coomassie Brilliant-Blau	27815	Fluka Feinchemikalien GmbH, Neu-Ulm
Dithiothreitol	6908	Roth GmbH, Karlsruhe
Dodecylsulfate Na-salt (SDS)	20760	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
EDTA	8043	Roth GmbH, Karlsruhe
EGTA	3054	Roth GmbH, Karlsruhe

Glycerin	3783.1	Roth GmbH, Karlsruhe
Glycerin	K22202211 630	Merck, Darmstadt
HEPES	05288	Biomol GmbH, Hamburg
Immunstar Western C Chemiluminescence Kit	170-5070	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
Magermilch-Pulver	T145.1	Roth GmbH, Karlsruhe
Marker Precision Plus Protein Western C	161-0376	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
Mercaptoethanol	M7154-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
NaCl	9265.1	Roth GmbH, Karlsruhe
Nonidet P-40	98379-10ML	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
NuPage Transferbuffer (20x) Novex	NP0006	Life technologies, Carlsbad, CA, USA
Precision Protein StrepTactin- HRP Conjugate	161-0380	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
Sodium fluoride	S7920-100G	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Sodium orthovanadate	S6508-10G	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Sodium pyrophosphate	221368	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Temed	2367.1	Roth GmbH, Karlsruhe
Tris	4855.3	Roth GmbH, Karlsruhe
Tween-20	P1379-500ML	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
β-Glycerophosphate	G5422-25G	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

8.1.3 Ge- und Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Typ	Hersteller
1,5 ml Tube	Protein Lo bind	Eppendorf AG, Hamburg
Einwegküvetten	67742	Sarstedt AG und Co. KG, Nümbrecht
PVDF-Membran, Immobilon P, 0,45 µm	IPVH 202000	Millipore GmbH, Schwalbach

Whatman Nitrocellulose Membranes	Protran	Z613630-1EA	Sigma-Aldrich Steinheim	Chemie	GmbH,
-------------------------------------	---------	-------------	----------------------------	--------	-------

8.1.4 Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Katalognummer	Hersteller
HRP-conjugated donkey-anti-rabbit IgG	1:2000	Sc-2313	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, USA
Rabbit-anti-NF-IL6, polyclonal IgG	1:500	Sc-150	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, USA
Rabbit-anti-β-Actin, polyclonal IgG	1:5000	A2066	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

8.2 Grundlagen der Methode

Der Western Blot ist eine Methode zum Nachweis von Proteinen (Renart et al. 1979). Dabei werden die Proteine zunächst durch Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt. Dies erfolgt unter Zugabe von Sodiumdodecylsulfat (SDS) und Mercaptoethanol, wodurch die Proteine denaturiert und Wechselwirkungen zwischen Proteinen verhindert werden. Somit erfolgt die Auftrennung der Proteine im porösen Acrylamidgel nur anhand ihres Molekulargewichtes, ohne Beeinflussung durch Ladungsunterschiede oder Tertiärstrukturen. Dieses Verfahren wird auch SDS-PAGE (SDS polacrylamide gel electrophoresis) genannt (Burnette 1981; Schagger und von Jagow 1987). Anschließend erfolgt die elektrophoretische Übertragung auf eine Trägermembran („Blot“). Hier wurden Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membranen verwendet, an denen die Proteine aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften blieben (Rehm T 2010). Auf dieser Membran können Proteine dann mit Hilfe einer Immunfärbung mittels spezifischer Antikörper sichtbar gemacht werden. Dazu müssen zunächst unspezifische Bindungen mit Magermilch geblockt werden, anschließend können die gesuchten Proteine mit spezifischen Primärantikörpern gebunden werden. Ein an eine HRP gekoppelter Sekundär-Antikörper ermöglicht dann im letzten Schritt eine Farbreaktion: Zugegebenes Luminol wird von der HRP oxidiert und emittiert daraufhin Licht, welches mit einer Kamera oder einem lichtempfindlichen Film detektiert werden kann (Rehm T 2010; Alegria-Schaffer 2014).

8.3 Proteinextraktion

Menge	Substanz
2,5 ml	0,5 M HEPES
3,125 ml	1,2 M NaCl
50 µl	100 % Nonidet P-40
10 ml	10 mM EGTA
0,5 ml	0,5 M EDTA
2,5 ml	150 mM Sodium Pyrophosphat
2,5 ml	1 M β-Glycerophosphat
2,5 ml	0,5 M Sodium Fluorid
625 µl	200 mM Sodium Orthovanadat
3,85 mg	Dithiothreit
1 Tablette	Protease Inhibitor Cocktail
450 µl	H ₂ O

Tabelle II-22

Zusammensetzung des Homogenisierungs-Puffers

Für die Western-Blot-Analyse wurden die Proteine aus Hypothalamus-Proben der Wildtyp-Mäuse extrahiert. Die Extraktion wurde nach dem Protokoll in Tabelle II-23 durchgeführt.

Arbeitsschritt	Durchführung	Dauer
Homogenisierungs-Puffer	100 µl	2 x 2 min
Homogenisierung	Zugabe von Beads (Ø 0,5 mm) Bullet Blender, Speed 9	
Überstand abnehmen	In neues Tube	
Zentrifugation	600 x g	15 min
Überstand abnehmen	In neues Tube	
	Quantifizierung und Lagerung bei -80 °C	

Tabelle II-23

Protokoll der Protein-Extraktion

Im Anschluss wurde die Protein-Menge mit Hilfe eines Bradford-Assays quantifiziert. Bradford-Reagenz enthält den Farbstoff Coomassie Brilliant-Blau. Dieser bildet mit Proteinen Komplexe, wodurch sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 auf 595 nm verschiebt. Die OD einer Protein-Bradford-Mischung bei 595 nm ist also

ein Maß für die Menge des in der Lösung vorhandenen Proteins (Bradford 1976). Die Proben wurden zunächst 1:10 mit *Aqua bidest.* verdünnt, anschließend wurden 2 µl der Probe mit 498 µl Wasser und 500 µl Bradford-Reagenz gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Danach wurde die OD bei 595 nm bestimmt. Anhand einer Standard-Verdünnungsreihe mit bovinem Serumalbumin (125 – 1.000 µg/ml) konnte eine Eichgerade erstellt und die Proteinkonzentration der Proben bestimmt werden.

8.4 Durchführung des Western Blots

Puffer A	
36,34 g	Tris
0,8 g	SDS
Auf 200 ml mit <i>Aqua bidest.</i> auffüllen, pH auf 8,8 einstellen	
Puffer B	
6,05 g	Tris
0,5 g	SDS
Auf 100 ml mit <i>Aqua bidest.</i> auffüllen, pH auf 6,8 einstellen	
Stock-Lösung	
7,5 ml	<i>Aqua bidest.</i>
2,5 ml	Acrylamid
10 ml	Puffer B
Trenngel-Ansatz (für 2 Gele)	
1,5 ml	<i>Aqua bidest.</i>
6 ml	Acrylamid
7,5 ml	Puffer A
97,5 µl	APS
11,3 µl	Temed
Sammelgel-Ansatz (für 2 Gele)	
3,75 ml	Stock-Lösung
45 µl	APS
6 µl	Temed
Sample Buffer	
2,13 ml	0,5 M Tris (pH 6,8)
5 ml	Glycerol
1 ml	10 %iges SDS
75 µl-Aliquots bei -20 °C einfrieren	

Je 25 µl	Mercaptoethanol (frisch vor Gebrauch zusetzen)
Running-Buffer	
37,5 g	Glycin
7,5 g	Tris
2,5 g	SDS
Auf 500 ml mit <i>Aqua bidest.</i> auffüllen	
Vor Gebrauch 1:5 mit <i>Aqua bidest.</i> verdünnen	
Transfer-Buffer	
NuPage Transferbuffer 1:20 mit <i>Aqua bidest.</i> verdünnen	

Tabelle II-24

Für den Western Blot verwendete Lösungen

Der Western Blot wurde nach dem Protokoll in Tabelle II-25 durchgeführt. Die eingesetzte Proteinmenge pro Tasche betrug 40 µg.

Arbeitsschritt	Durchführung	Dauer
Gele gießen		
Trenngel gießen	Trenngel-Ansatz: ca. 7 ml pro Glaskammer, mit <i>Aqua bidest.</i> überschichten	35 min
Polymerisation	RT	
<i>Aqua bidest.</i> entfernen	abgießen	
Sammelgel gießen	Sammelgel-Ansatz: ca. 1,8 ml pro Glaskammer über das Trenngel schichten, Kamm einstecken	35 min
Polymerisation	RT	
Kämme entfernen, Aufbewahrung bis zur Elektrophorese in feuchter Kammer		
Elektrophorese		
Proben verdünnen	Mit Sample-Buffer auf 40 µg Protein / 20 µl	8 min
Denaturierung	95 °C im Wasserbad	
Vorbereitung der Gelkammer	Gele in Kammer einsetzen, Running-Buffer zugeben	
Taschen spülen	Mit Running-Buffer	100 min
Gel beladen	20 µl Probe / 3,5 µl Western C Standard	
Elektrophorese	140 V, 2 A	
Blot		
Whatman-Paper vorbereiten	In Transfer-Buffer einweichen	
PVDF-Membranen aktivieren	Erst in 70 % Ethanol, dann in <i>Aqua bidest.</i>	

Aufbau der Blot-Schichten	Von unten nach oben: Whatman-Paper - PVDF-Membran mit rauer Seite nach oben - Gel - Whatman-Paper Eingeschlossene Luft entfernen	
Blot	0,18 A, 15 V	65 min
PVDF-Membran trocknen lassen und beschriften		

Tabelle II-25
Arbeitsschritte des Western Blots

8.5 Immunfärbung

TBS	
12,11 g	Tris
87,66 g	NaCl
Auf 1000 ml mit <i>Aqua bidest.</i> auffüllen, pH auf 8,0 einstellen, autoklavieren	
Vor Gebrauch 1:10 mit <i>Aqua bidest.</i> verdünnen	
TBST	
999,5 ml	TBS
0,5 ml	Tween-20
Blockungs-Lösung	
20 g	Magermilch
200 ml	TBST
1. AK –Lösung	
5 ml	Blockungs-Lösung
5 ml	TBST
2 µl	Rabbit-anti-β-Actin (1:5000)
20 µl	Rabbit-anti-NF-IL6 (1:500)
2. AK-Lösung	
40 ml	TBST
20 µl	HRP-anti-rabbit (1:2000)
5,8 µl	StrepTactin HRP (1:7000)

Tabelle II-26
Für die Immunfärbung verwendete Lösungen

Die Detektion der gesuchten Proteine (β-Actin als Referenz und NF-IL6) auf der Membran wurde nach dem Protokoll in Tabelle II-27 durchgeführt.

Arbeitsschritt	Durchführung	Dauer
PVDF-Membran aktivieren	In 70 % Ethanol und danach in <i>Aqua bidest.</i> eintauchen	
Blocken	Blockungs-Lösung	1 h
1. Antikörper	1. AK-Lösung, in feuchter Kammer	Über Nacht
waschen	TBST	3 x 10 min
2. Antikörper	2. AK-Lösung	1 h
waschen	TBST	2 x 10 min
waschen	TBS	10 min
Farbreaktion starten	ImmunStar Western C Chemiluminescence Kit (beide Komponenten 1:1 mischen)	5 min
Detektion	Fotografieren im Chemidoc XRS	

Tabelle II-27

Protokoll der Immunfärbung

Die Detektion der gefärbten Protein-Banden auf der PVDF-Membran erfolgte im Molecular Imager Chemidoc XRS und mit Hilfe der Software Quantity One. Die Chemilumineszenz wurde mit einer „starting exposure time“ von 60 s, einer „total exposure time“ von 600 s und 10 „exposures“ aufgenommen.

8.6 Gel-Gegenfärbung

Staining Solution	
0,1 %	Coomassie Brilliant-Blau
50 %	Ethanol
10 %	Eisessig
40 %	<i>Aqua bidest.</i>
Destaining-Solution	
50 %	Ethanol
10 %	Eisessig
40 %	<i>Aqua bidest.</i>
Drying-Solution	
4 %	Glycerin
20 %	Ethanol
76 %	<i>Aqua bidest.</i>

Tabelle II-28

Für die Gel-Gegenfärbung verwendete Lösungen

Zur Überprüfung, ob die Proteine während des Blots vollständig vom Gel auf die PVDF-Membran übertragen wurden, wurden die Gele mit Coomassie Brilliant-Blau gegengefärbt (Gallagher und Chakavarti 2008). Dazu wurden die Gele 3 h in „Staining-Solution“ auf einem Schüttler bei RT gefärbt. Anschließend wurden diese unter mehrfachem Wechseln der Lösung in „Destaining-Solution“ wieder entfärbt, bis der Gelhintergrund transparent war. Nach diesem Vorgang sollte nur noch verbliebenes Protein im Gel blau gefärbt sein. Anschließend wurden die Gele 2 h in „Drying-Solution“ inkubiert. Diese verhinderte, dass die Gele in der anschließenden Trocknung brüchig wurden.

8.7 Auswertung und Statistik

Mit der Software Quantity One wurden die auf den Fotos sichtbaren Banden automatisch detektiert und ihre Dichte sowie ihr Molekulargewicht im Vergleich zu den jeweils verwendeten Western C Standards analysiert. Die so erhaltenen Daten wurden anschließend in Excel-Dateien exportiert. Um eventuelle Unterschiede in der eingesetzten Proteinmenge auszugleichen, wurde das Verhältnis (NF-IL6 : β -Actin) x 100 berechnet. Die Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Gelen wurde dadurch gewährleistet, dass einige Proben auf mehreren Gelen gleichzeitig analysiert wurden und somit als Kalibrator dienten.

Für jede experimentelle Gruppe wurden Mittelwert und Standardfehler der so erhaltenen Werte berechnet. Die Auswertung erfolgte für den 8-h- und den 24-h-Perfusionszeitpunkt jeweils mit einem Student's t-Test.

9. Färbung von Ausstrichen

9.1 Materialien

9.1.1 Chemikalien

Bezeichnung	Katalog-Nummer	Hersteller
Aceton	00585-2.5L	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Giemsa	1.09204.1000	Merck, Darmstadt
May-Grünwald-Lösung	1.01424.1000	Merck, Darmstadt

9.2 Grundlagen der Methode

Die May-Grünwald-Lösung besteht aus Eosin und angesäuertem Methylenblau gelöst in Methanol und Wasser. Gewebestrukturen werden dadurch abhängig von ihrem pH-Wert angefärbt. Somit eignet sich diese Färbung insbesondere zur Anfärbung und Unterscheidung der verschiedenen Granula der Granulozyten. Basophile Granula erscheinen dunkelblau, saure Granula rot und neutrophile Granula werden nicht gefärbt.

Die Giemsa-Lösung enthält Azur A-Eosinat, Azur B-Eosinat, Methylenblau-Eosinat und Methylenblauchlorid gelöst in Methanol und Glycerin. Durch Komplexbildung der Farbstoffe mit DNA erscheinen Zellkerne leuchtend rot, Zytoplasma hingegen wird bläulich angefärbt (Giemsa 1904).

Die Kombination beider Färbelösungen ermöglicht eine zuverlässige Färbung und Differenzierung von Blutzellen (Pappenheim 1919).

9.3 Versuchsprotokoll

Ausstriche wurden unmittelbar nach der Perfusion der Tiere aus Blut und aus dem Inhalt der Kapsel, die die KO um den Sender gebildet hatten, hergestellt. Die Ausstriche wurden getrocknet und aufbewahrt und schließlich am Ende der *in vivo*-Versuchsreihe alle gleichzeitig nach folgendem Protokoll gefärbt.

Arbeitsschritt	Dauer
May-Grünwald-Lösung	2 min
<i>Aqua bidest.</i>	3 min
Giemsa-Lösung (10 ml Aqua bidest + 15 Tropfen Giemsa)	15 min
Mit <i>Aqua bidest.</i> abspülen	
Trocknen der Ausstriche	
Rückseite mit Aceton reinigen	

Tabelle II-29

Protokoll der May-Grünwald-Giemsa-Färbung

9.4 Auswertung

Die Ausstriche wurden nach der Färbung lichtmikroskopisch beurteilt. Dabei wurden pro Ausstrich 100 Leukozyten nach ihrer Art differenziert und die so erhaltenen Prozentzahlen für jede Leukozytenart mit den Referenzwerten für Mäuseblut verglichen (siehe Tabelle II-30).

Zelltyp	Anteil [% der Leukozyten]
Lymphozyten	40-90
Neutrophile Granulozyten	10-60
Eosinophile Granulozyten	0-7
Basophile Granulozyten	0-1
Monozyten	0-3

Tabelle II-30

Hämatologische Referenzwerte der Maus nach (Loeffler 2002)

III. Ergebnisse

1. Physiologische Parameter von NF-IL6-Knockout-Mäusen sowie Wildtyp-Mäusen unter basalen Bedingungen, bei „novel environment stress“ und bei LPS-induzierter systemischer Entzündung

Zur Induktion eines psychologischen Stresses wurden die Tiere einem „novel environment stress“ / Käfigwechsel ausgesetzt. Hierfür wurde die Reaktion jeder Maus nach Wechsel vom Haltungskäfig in den Experimentalkäfig über 4 h aufgezeichnet. Eine systemische Entzündung wurde durch i.p. Injektion von LPS (50 oder 2500 µg/kg) ausgelöst, während Kontrolltiere PBS erhielten. Die Anzahl der verwendeten Tiere ist in Tabelle III-1 zu sehen. Zur Überwachung der „sickness response“ dieser Tiere wurden Körperkerntemperatur, Aktivität, Futter- und Wasseraufnahme sowie Körpergewicht erfasst.

Genotyp	Behandlung	Perfusionszeitpunkt	Anzahl der Tiere
WT	NES	/	36
	PBS	8 h	6
		24 h	8
	50 µg/kg LPS	/	8
	2,5 mg/kg LPS	8 h	6
		24 h	8
KO	NES	/	25
	PBS	8 h	2
		24 h	5
	50 µg/kg LPS	/	7
	2,5 mg/kg LPS	8 h	5
		24 h	6

Tabelle III-1

Anzahl der Tiere in den verschiedenen experimentellen Gruppen

1.1 Körperkerntemperatur

Abbildung III-1 stellt die Körperkerntemperatur der Mäuse in Reaktion auf die verschiedenen Stimuli dar.

Auf das Handling und die Injektion von PBS (A) reagierten die Tiere mit einem kurzen Stresspeak. Ansonsten zeigten die Kontrolltiere einen normalen zirkadianen Rhythmus mit niedrigerer Körpertemperatur während des Tages und einer höheren Körpertemperatur während der nächtlichen Aktivitätsphase.

Nach Injektion der niedrigen LPS-Dosis (B) entwickelten KO und WT eine Fieberantwort, die etwa 7 h anhielt. Die KO hingegen zeigten zusätzlich einen Trend zu einer zweiten, späten Fieberphase am Morgen des Tages nach der Injektion ($p = 0,072$).

Auf die Injektion der hohen LPS-Dosis (C) reagierten die WT mit einer Fieberantwort, die über 24 h bis zum Ende der Aufzeichnung anhielt und den Tag-Nacht-Rhythmus der Tiere aufhob. Interessanterweise zeigten die KO hingegen 3 bis 7 h nach Injektion des LPS kein Fieber (*post-hoc* $p = 0.00016$ und $p = 0.00659$). 7 bis 24 h nach der Injektion wiesen die KO jedoch eine normale Fieberantwort auf, ähnlich wie die der WT.

Auf den NES (D) reagierten die Tiere beider Genotypen mit einem Anstieg der Körperkerntemperatur während der ersten beiden Stunden nach Beginn des Stresses. Anschließend fiel ihre Körpertemperatur wiederum ab und erreichte 3 h nach Beginn des NES Werte unterhalb der „baseline“.

Zusammenfassend zeigten die KO also gegenüber den WT eine stark reduzierte Fieberantwort 3 bis 7 h nach Injektion der hohen LPS-Dosis und eine tendenziell verlängerte Fieberantwort 24 h nach Stimulation mit der niedrigen LPS-Dosis.

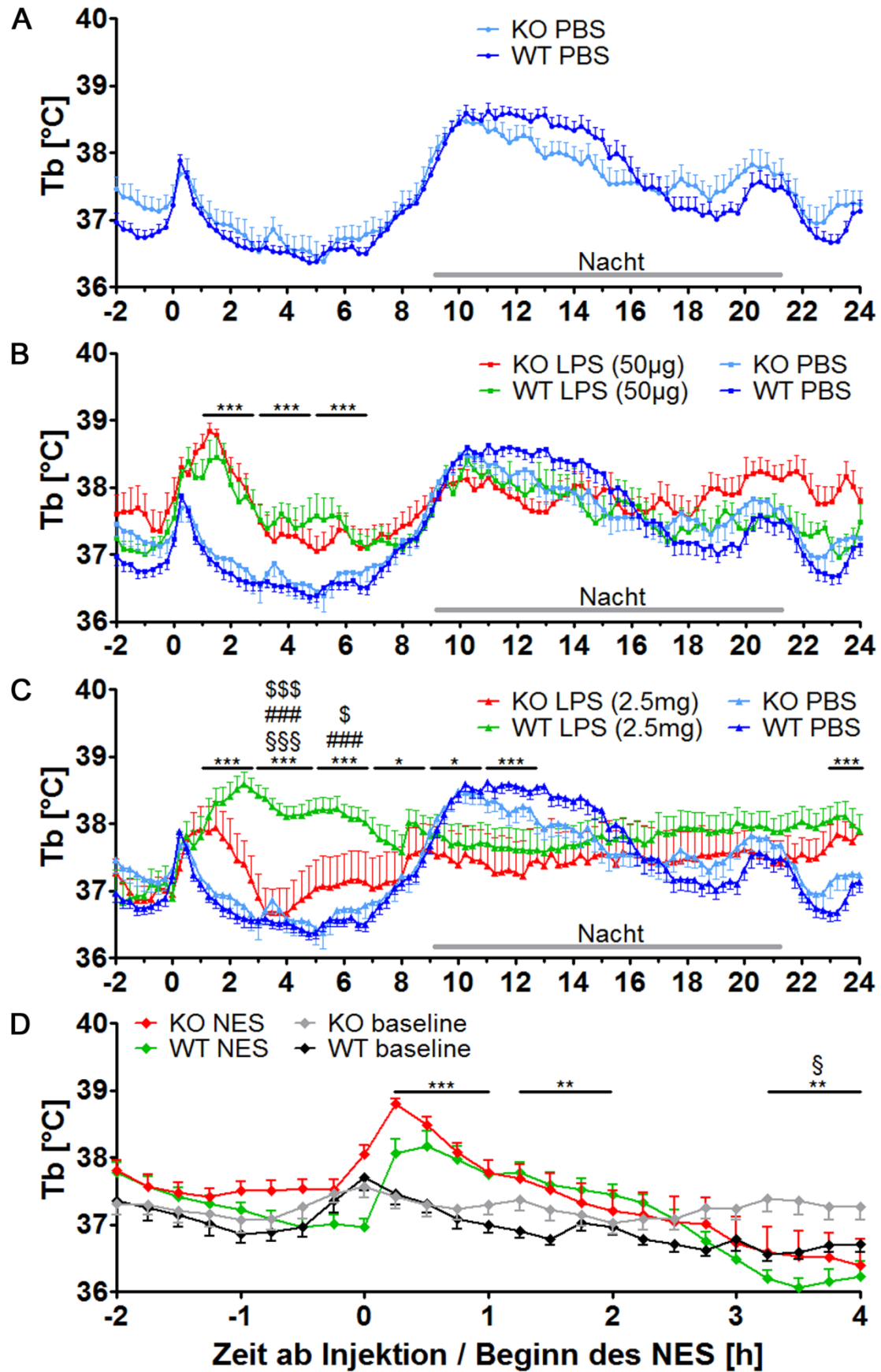


Abbildung III-1

Körperkerntemperatur (Tb) der Mäuse nach Injektion von „phosphate-buffered saline“ (PBS) (A), 50 µg/kg Lipopolysaccharid (LPS; B) und 2,5 mg/kg LPS (C) sowie während des „novel environment stress“ (NES; D). Die KO zeigen gegenüber den WT ein deutlich reduziertes Fieber 3 bis 7 h nach Injektion der hohen LPS-Dosis und eine tendenziell verlängerte Fieberantwort nach Injektion der niedrigen LPS-Dosis. *Haupteffekt Behandlung, §Haupteffekt Genotyp, # WT LPS vs. WT PBS, \$ WT LPS vs. KO LPS

1.2 Aktivität

Abbildung III-2 zeigt die Aktivität der Tiere nach den verschiedenen Stimulationen.

Die WT (A) demonstrierten nach PBS-Injektion den typischen zirkadianen Rhythmus mit niedriger Aktivität tagsüber und hoher Aktivität während der Nacht. LPS reduzierte insbesondere die nächtliche Aktivität der Tiere Dosis-abhängig. Die KO (B) hingegen wiesen bereits basal eine deutlich niedrigere Aktivität auf als die WT, wobei jedoch keine Anzeichen für eventuelle Schmerzen oder andere störende Umstände als mögliche Ursache erkennbar waren. Durch LPS konnte die Aktivität der KO kaum weiter verringert werden. Auch die Auswertung der kumulativen Aktivität über 24 h (D) zeigte die basal drastisch reduzierte Aktivität in den KO gegenüber den WT (*post-hoc* $p < 0,0001$) sowie die LPS-induzierte, Dosis-abhängige Reduktion der Aktivität in den WT.

Auf den NES (C) reagierten die WT erst mit einer Erhöhung der Aktivität, die auf Erkundungsverhalten in der unbekannten Umgebung zurückzuführen ist. Nach etwa 2 h sank ihre Aktivität jedoch wieder auf die basalen Werte ab. Die Aktivität der KO hingegen war während der gesamten 4 h der Messung und somit auch gegenüber den WT 2 bis 4 h nach Beginn des NES deutlich erhöht (*post-hoc* $p < 0,001$ für 2 - 3 h bzw. $p < 0,01$ für 3 - 4 h). Dieses Ergebnis deutete außerdem darauf hin, dass die KO keine generelle Störung der lokomotorischen Aktivität aufwiesen.

Insgesamt zeigten die KO also basal eine deutlich verminderte Aktivität im Vergleich zu den WT, jedoch eine erhöhte Aktivität 2 bis 4 h nach dem NES.

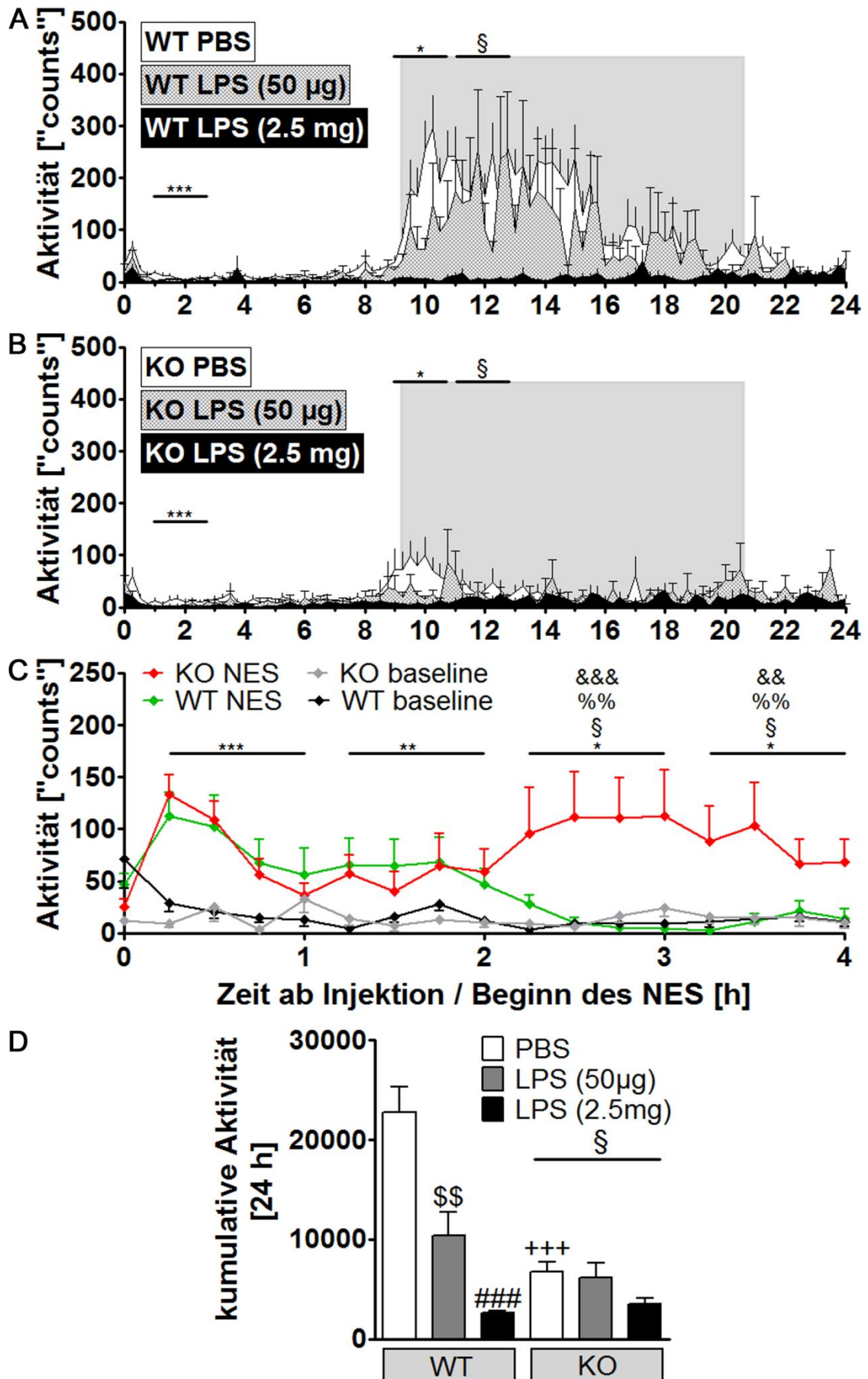


Abbildung III-2

Verlauf der Aktivität der WT (A) und KO (B) nach Injektion von „phosphate-buffered saline“ (PBS), 50 µg/kg Lipopolysaccharid (LPS) oder 2,5 mg/kg LPS. (C) zeigt die Aktivität der Tiere während des „novel environment stress“ (NES). (D) zeigt die kumulative Aktivität der Tiere über 24 h nach Injektion von PBS und den beiden Dosen LPS. Die KO zeigten eine reduzierte basale Aktivität im Vergleich zu den WT, jedoch eine erhöhte Aktivität 2 bis 4 h nach Beginn des NES. *Haupteffekt Behandlung, §Haupteffekt Genotyp, # 2,5 mg/kg LPS vs. PBS, \$ 50 µg/kg LPS vs. PBS, + WT PBS vs. KO PBS, & WT NES vs. KO NES, % KO NES vs. KO „baseline“

1.3 Futter- und Wasseraufnahme

In Abbildung III-3 sind die Wasser- (A) und Futteraufnahme (B) der Tiere über 24 h nach der Behandlung dargestellt. Beide Genotypen zeigten eine LPS-Dosis-abhängige Reduktion der Futter- und Wasseraufnahme gegenüber den PBS-behandelten Kontrolltieren (Haupteffekt Behandlung, beide $p < 0,0001$). Die KO zeigten tendenziell eine etwas verringerte Anorexie nach der hohen LPS-Dosis als die WT, es wurden jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen beiden Genotypen erreicht.

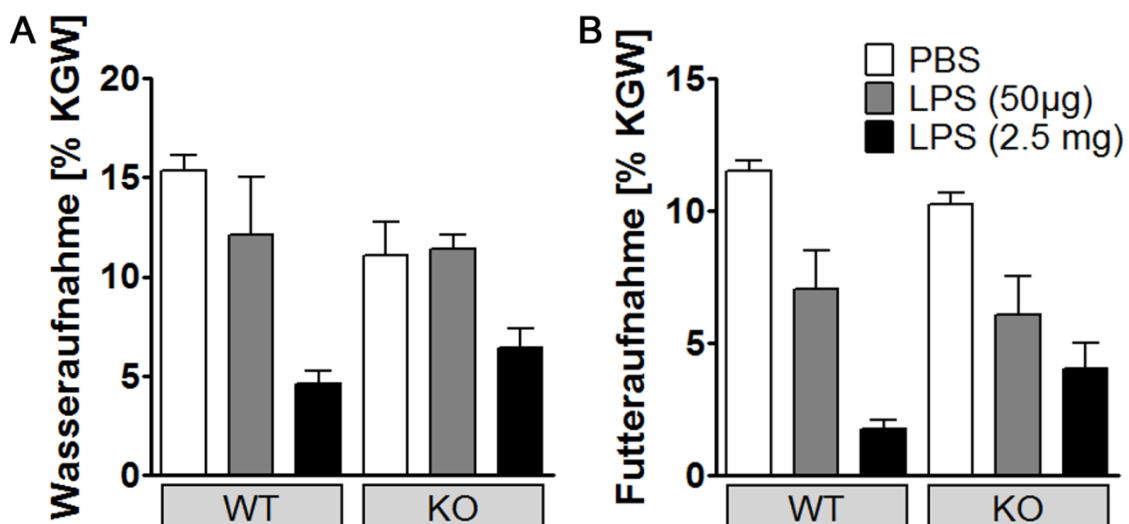


Abbildung III-3

Wasser- (A) und Futteraufnahme (B) der Tiere prozentual zu ihrem Körpergewicht (KGW) über 24 h nach Behandlung mit „phosphate-buffered saline“ (PBS), 50 µg/kg Lipopolysaccharid (LPS) oder 2,5 mg/kg LPS. Beide Genotypen zeigten eine LPS-Dosis-abhängige Anorexie und Adipsie.

1.4 Körpergewicht

Die KO wiesen gegenüber den WT eine leicht erhöhte tägliche Zunahme ihres Körpergewichts auf (Abbildung III-4, *post-hoc* $p < 0,05$). Die hohe LPS-Dosis führte in beiden Genotypen zu einer deutlichen Gewichtsabnahme.

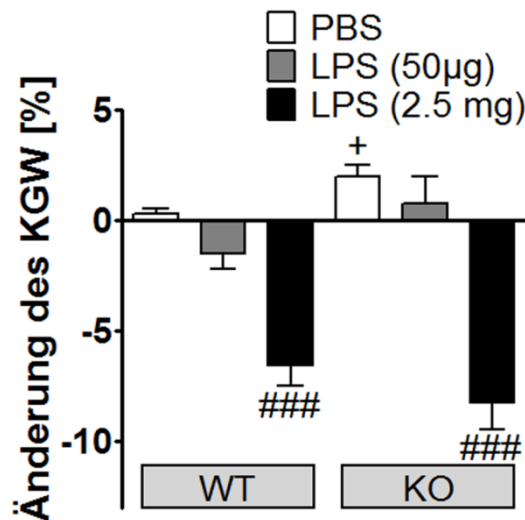


Abbildung III-4

Änderung des Körpergewichts (KGW) der Tiere über 24 h nach Injektion von „phosphate-buffered saline“ (PBS), 50 µg/kg Lipopolysaccharid (LPS) oder 2,5 mg/kg LPS. KO zeigten im Vergleich zu den WT eine erhöhte basale tägliche Zunahme. # 2,5 mg/kg LPS vs. PBS, + KO PBS vs. WT PBS

1.5 Ausstriche des Blutes und des Kapselinhalts

Während der Perfusion wurde den Tieren Blut entnommen. Die meisten KO hatten außerdem um den implantierten Sender eine Kapsel gebildet, die geringgradig mit Flüssigkeit gefüllt war. Eine solche Kapsel wurde in WT nicht gefunden. Von einigen Tieren wurden Ausstriche des Blutes und – bei KO – des Inhalts dieser Kapsel angefertigt. Bei diesen Ausstrichen wurde anschließend eine Leukozyten-Differenzierung durchgeführt (Tabelle III-2). Der Anteil der verschiedenen Leukozyten im Blut der PBS-behandelten WT und KO entsprach den Referenzbereichen. 8 und 24 h nach der LPS-Stimulation zeigten die KO einen erhöhten Anteil neutrophiler Granulozyten und – damit einhergehend – einen verminderten Anteil Lymphozyten. Blutausstriche von LPS-behandelten WT waren nicht verfügbar.

Der Inhalt der von den KO um den implantierten Sender gebildeten Kapsel wies, unabhängig von der Behandlung der Tiere, hohe Anteile neutrophiler sowie eosinophiler Granulozyten auf.

	Lymphozyten [%]	Monozyten [%]	Neutrophile Granulozyten [%]	Eosinophile Granulozyten [%]	Basophile Granulozyten [%]
Referenzbereich	40-90	0-3	10-60	0-7	0-1
Blut					
WT PBS	54,6 ± 2,5	0,6 ± 0,4	42,2 ± 3,5	2,4 ± 0,7	0,2 ± 0,2
KO PBS	61,5 ± 0,5	2 ± 2	34,5 ± 4,5	2 ± 2	0 ± 0
KO LPS 8h	14,3 ± 0,9	2 ± 1,5	81,7 ± 1,9	2 ± 0,6	0 ± 0
KO LPS 24h	12 ± 3	1,5 ± 0,5	85,5 ± 3,5	1 ± 0	0 ± 0
Kapselinhalt					
KO PBS	17,3 ± 3,7	4 ± 1,1	66 ± 4,5	11,8 ± 4,5	1 ± 0,7
KO LPS 8h	9 ± 1,8	0,3 ± 0,3	76,3 ± 3,4	13,5 ± 4,2	1 ± 0,7
KO LPS 24h	6,5 ± 1,5	1,5 ± 0,5	74 ± 4	16,5 ± 1,5	1,5 ± 1,5

Tabelle III-2

Anteil der verschiedenen Leukozyten-Arten im Blut bzw. im Inhalt der Kapsel, die die KO um die implantierten Sender gebildet hatten. Die Werte der Blutaussstriche der „phosphate-buffered saline“ (PBS)-behandelten KO und WT lagen im Referenzbereich. Nach Lipopolysaccharid (LPS)-Stimulation zeigten die KO eine Neutrophilie. Der Kapselinhalt der Tiere wies hohe Anteile neutrophiler und eosinophiler Granulozyten auf.

2. Charakterisierung der Bedeutung von NF-IL6 für den humoralen

Kommunikationsweg zum Gehirn

Um die zugrunde liegenden Mechanismen der beobachteten Veränderungen der Physiologie der Tiere zu untersuchen, wurde zunächst der humorale Kommunikationsweg zum Gehirn analysiert. Dazu wurden zuerst zirkulierende inflammatorische Mediatoren im Blut (IL-6, IL-10 und TNFα) gemessen. Anschließend wurde die Expression inflammatorischer Mediatoren, wichtiger Transkriptionsfaktoren sowie für die „sickness response“ relevanter Zielgene im Hypothalamus analysiert.

2.1 Mediatoren in der Peripherie

8 h nach Injektion der hohen LPS-Dosis zeigten alle Tiere einen starken Anstieg der Plasma-IL-6- (Abbildung III-5 A) und -IL-10-Level (C). In den KO war dieser Anstieg jedoch signifikant niedriger als in den WT (beide *post-hoc* $p < 0,05$). Dieser verminderte Anstieg der IL-6-Plasmalevel in den KO könnte eine mögliche Erklärung für das reduzierte Fieber der KO 3 bis 7 h nach LPS-Injektion sein. 24 h nach der Behandlung hatten die IL-6-Plasmaspiegel (B) in beiden Genotypen wieder basales Niveau erreicht, wobei jedoch die basalen – und damit auch die LPS-stimulierten – IL-6-Level der KO gegenüber den WT erhöht waren (Haupteffekt Genotyp $p = 0,0005$). Diese basal erhöhten Plasma-IL-6-Werte wurden bereits früher beschrieben (Screpanti et al. 1995). Die IL-10-Plasmalevel (D) zeigten 24 h nach LPS-Stimulation noch eine geringgradige Erhöhung im Vergleich zu den PBS-behandelten Kontrollen (Haupteffekt Behandlung $p < 0,0001$). Die IL-10-Spiegel der KO waren jedoch gegenüber denen der WT signifikant erhöht (*post-hoc* $p < 0,001$). Das Verhältnis zwischen IL-6 und IL-10 kann als zusätzlicher Hinweis darauf herangezogen werden, ob in den Tieren insgesamt ein eher pro- oder eher anti-inflammatorischer Status herrscht. 8 h nach LPS-Stimulation (E) zeigten die WT ein stark erhöhtes IL-6 : IL-10-Verhältnis, was auf einen starken pro-inflammatorischen Zustand hindeutete. Die KO hingegen wiesen ein im Vergleich zu den WT signifikant niedrigeres IL-6 : IL-10-Verhältnis auf (*post-hoc* $p < 0,05$). 24 h nach LPS-Stimulation (F) war das IL-6 : IL-10-Verhältnis der WT wieder auf basale Level gesunken, während es in den KO gegenüber den WT geringgradig erhöht war (Haupteffekt Genotyp $p < 0,01$). Im Vergleich zu den basalen Werten, die in den KO aufgrund der erhöhten basalen IL-6-Spiegel gegenüber den WT erhöht waren, war das IL-6 : IL-10-Verhältnis in den KO 24 h nach LPS-Stimulation jedoch erniedrigt.

Es wurde zusätzlich auch TNF α im Blutplasma gemessen, dieses war jedoch in allen Proben nicht detektierbar.

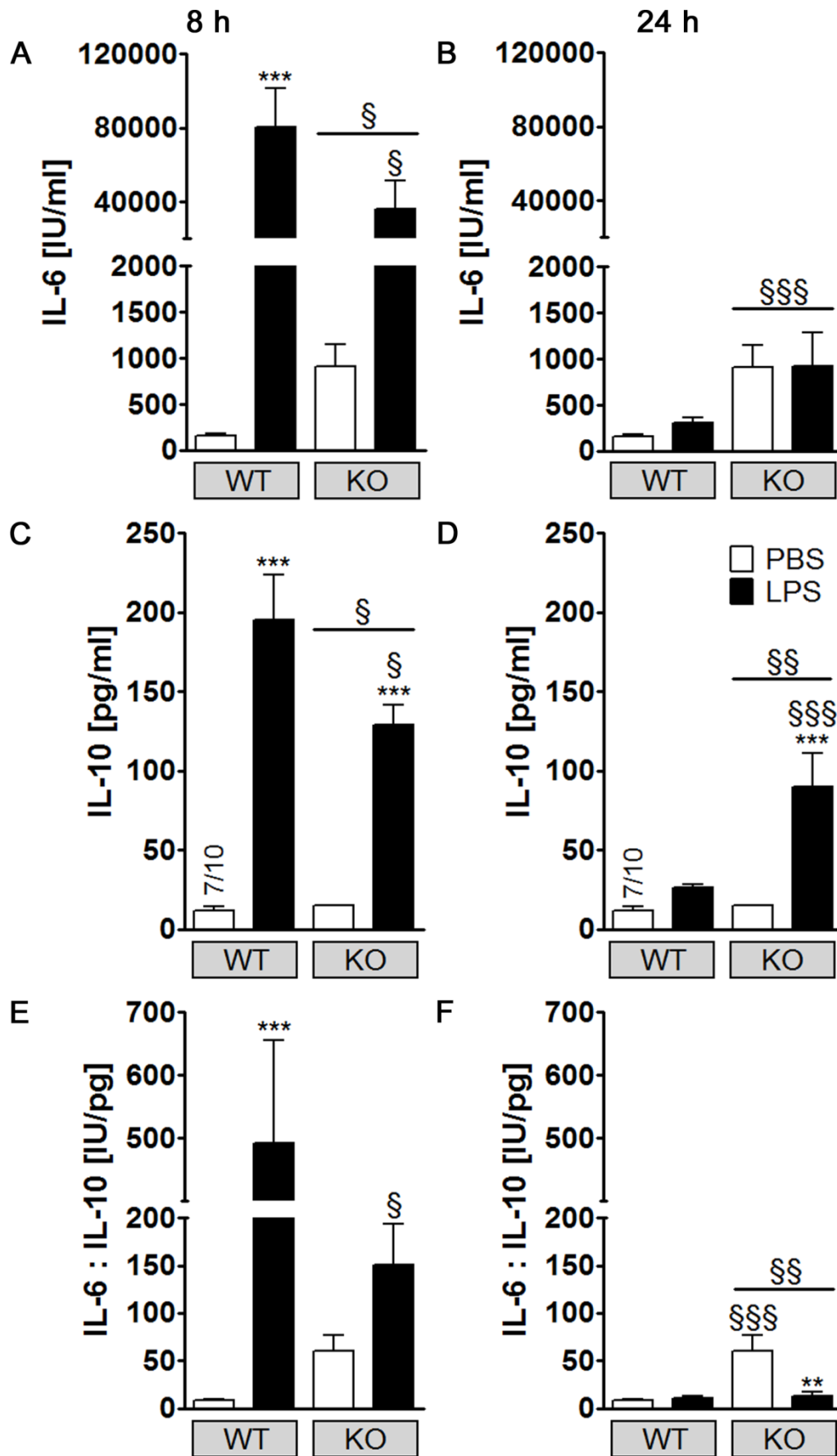


Abbildung III-5

Plasmalevel von Interleukin (IL)-6 8 h (A) und 24 h (B) sowie von IL-10 8 h (C) und 24 h (D) nach Stimulation mit „phosphate-buffered saline“ (PBS) oder 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS). Der Anstieg der Zytokin-Spiegel 8 h nach LPS-Stimulation war in KO signifikant niedriger als in WT. 24 h nach LPS-Stimulation waren die Zytokin-Spiegel der KO jedoch signifikant höher als in WT. Das Verhältnis zwischen IL-6 und IL-10 zeigte 8 h nach LPS-Stimulation (E) einen weniger pro-inflammatorischen Status in den KO gegenüber den WT, 24 h nach LPS-Stimulation (F) zeigten die KO eine geringgradig erhöhte IL6 : IL-10-Ratio im Vergleich zu den WT. § Haupteffekt Genotyp, § KO vs. WT, * LPS vs. PBS, 7/10 = 7 von 10 Proben waren detektierbar

Des Weiteren wurde die Expression verschiedener Zytokine in der Leber 8 (Abbildung III-6) und 24 h (Abbildung III-7) nach der Behandlung untersucht, was weitere Hinweise auf periphere inflammatorische Mediatoren geben sollte. 8 h nach LPS-Stimulation zeigten WT und KO gleichermaßen einen Anstieg der Expression von IL-1 β (Abbildung III-6, A, Haupteffekt Behandlung $p < 0,0001$), IL-1ra (D, Haupteffekt Behandlung $p < 0,0001$) und IL-10 (E, Haupteffekt Behandlung $p < 0,0001$) in der Leber. Die IL-6-Expression (B) war in den WT stark erhöht, während dieser Anstieg in den KO deutlich niedriger war (*post-hoc* $p < 0,001$). Die TNF α -Expression (C) hingegen zeigte in den KO einen gegenüber den WT verstärkten LPS-induzierten Anstieg (*post-hoc* $p < 0,01$).

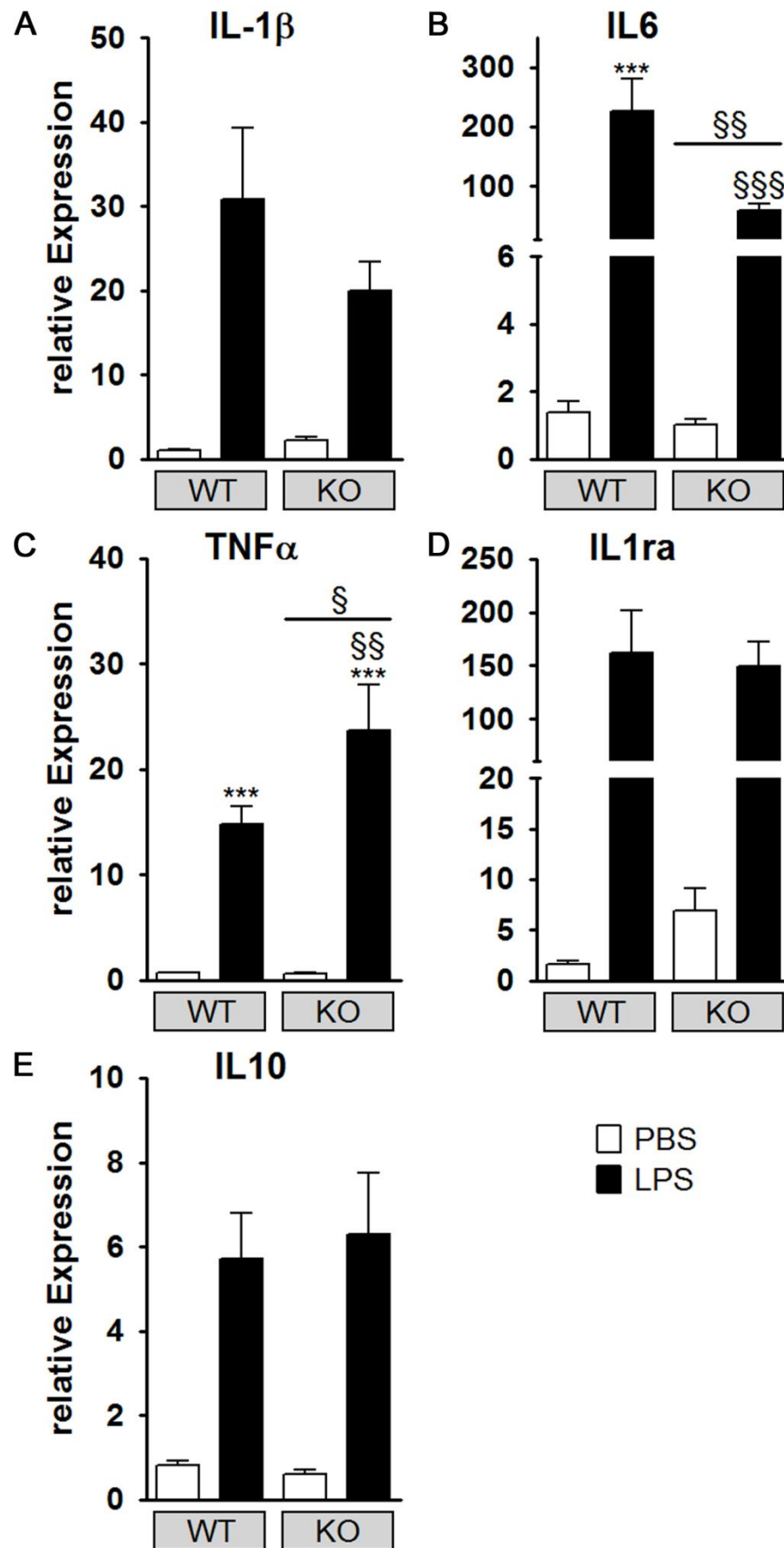


Abbildung III-6

Expression von Interleukin (IL)-1 β (A), IL-6 (B), Tumornekrosefaktor (TNF) α (C), IL-1-Rezeptor-Antagonist (ra; D) und IL-10 (E) in der Leber 8 h nach Stimulation mit „phosphate-buffered saline“ (PBS) oder 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS). KO zeigten im Vergleich zu WT einen verminderten LPS-induzierten Anstieg der IL-6-Expression sowie des IL-6 : IL-10-Verhältnisses. Die TNF α -Expression der KO hingegen war nach LPS-Behandlung gegenüber den WT erhöht. § Haupteffekt Genotyp, § WT vs. KO, * LPS vs. PBS

24 h nach LPS-Stimulation (Abbildung III-7) zeigten WT und KO noch eine erhöhte Expression von IL-1 β (A, Haupteffekt Behandlung $p < 0,0001$), IL-6 (B, Haupteffekt Behandlung $p < 0,0001$), TNF α (C, Haupteffekt Behandlung $p < 0,0001$), IL-1ra (D, Haupteffekt Behandlung $p < 0,0001$) und IL-10 (E, Haupteffekt Behandlung $p < 0,0001$). Lediglich die IL-10-Expression wies in den KO einen verminderten LPS-induzierten Anstieg im Vergleich zu den WT auf (*post-hoc* $p < 0,01$).

Insgesamt zeigten die KO also 8 h nach LPS-Stimulation einen gegenüber den WT teilweise verminderten, teilweise unveränderten Anstieg der peripheren inflammatorischen Mediatoren. Lediglich die TNF α -Expression in der Leber war nach LPS-Stimulation in den KO gegenüber den WT erhöht; im Plasma war jedoch kein TNF α nachweisbar. 24 h nach LPS-Stimulation wiesen die KO gegenüber den WT teils erhöhte ansonsten unveränderte periphere inflammatorische Mediatoren auf.

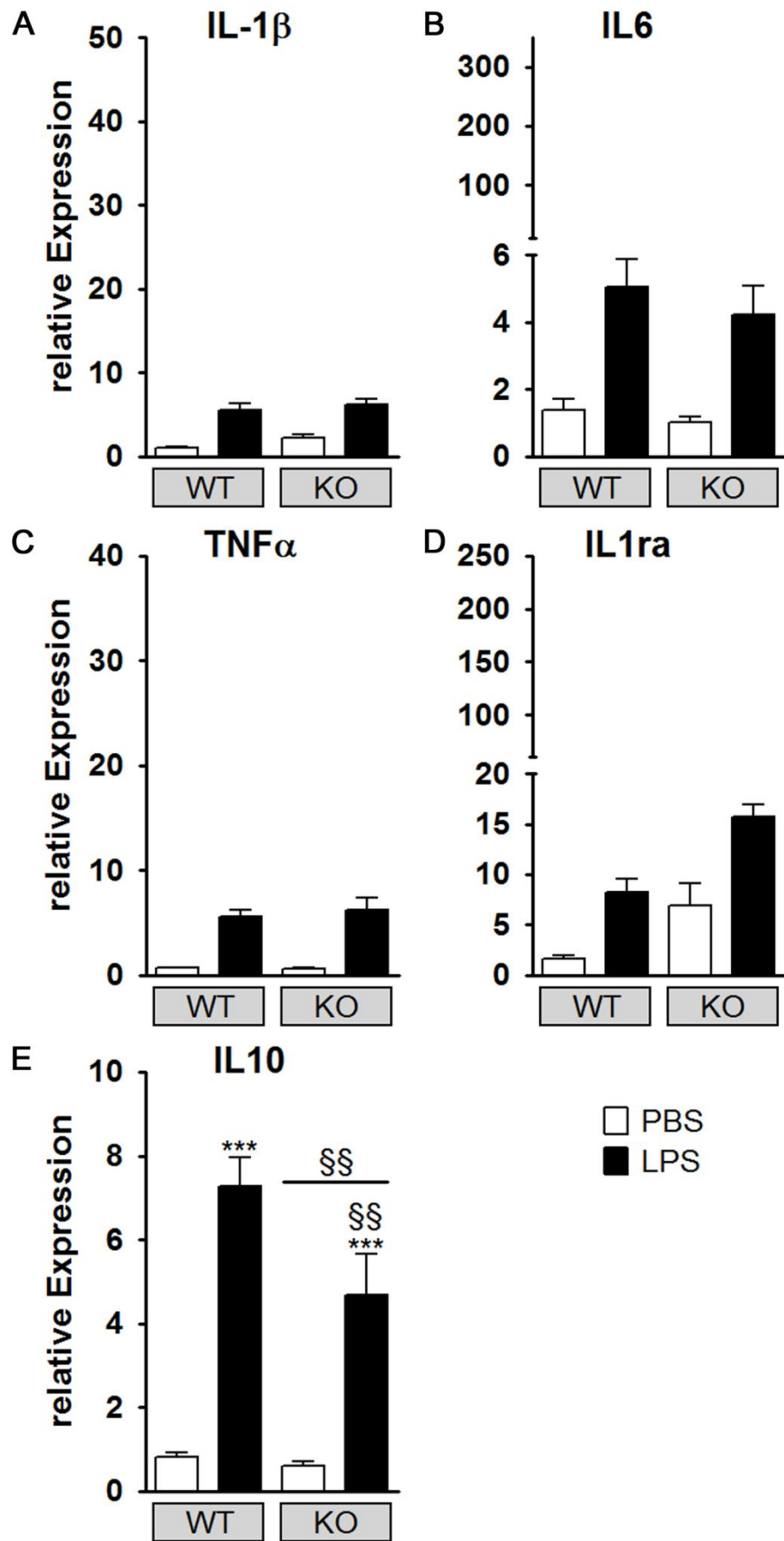


Abbildung III-7

Expression von Interleukin (IL)-1 β (A), IL-6 (B), Tumornekrosefaktor (TNF) α (C), IL-1-Rezeptor-Antagonist (ra; D) und IL-10 (E) in der Leber 24 h nach Stimulation mit „phosphate-buffered saline“ (PBS) oder 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS). Beide Genotypen zeigten nach LPS-Stimulation erhöhte Expression der untersuchten Mediatoren im Vergleich zu den PBS-behandelten Kontrollen. Der LPS-induzierte Anstieg der IL-10-Expression war jedoch in den KO gegenüber den WT vermindert. § Haupteffekt Genotyp, § WT vs. KO, * LPS vs. PBS

2.2 Mediatoren im ZNS

Zur Untersuchung der zentralen inflammatorischen Mediatoren wurde 8 h (Abbildung III-8) und 24 h (Abbildung III-9) nach Stimulation die hypothalamische mRNA-Expression der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β (A), IL-6 (B) und TNF α (C), sowie der anti-inflammatorischen Mediatoren IL-1ra (D) und IL-10 (E) analysiert.

Alle untersuchten Zytokine zeigten 8 h nach LPS-Stimulation einen Anstieg ihrer Expression. Dieser Anstieg war bei IL-6 (*post-hoc* $p < 0,001$), TNF α (*post-hoc* $p < 0,001$) und IL-10 (*post-hoc* $p < 0,01$) in den KO jedoch signifikant niedriger als in den WT.

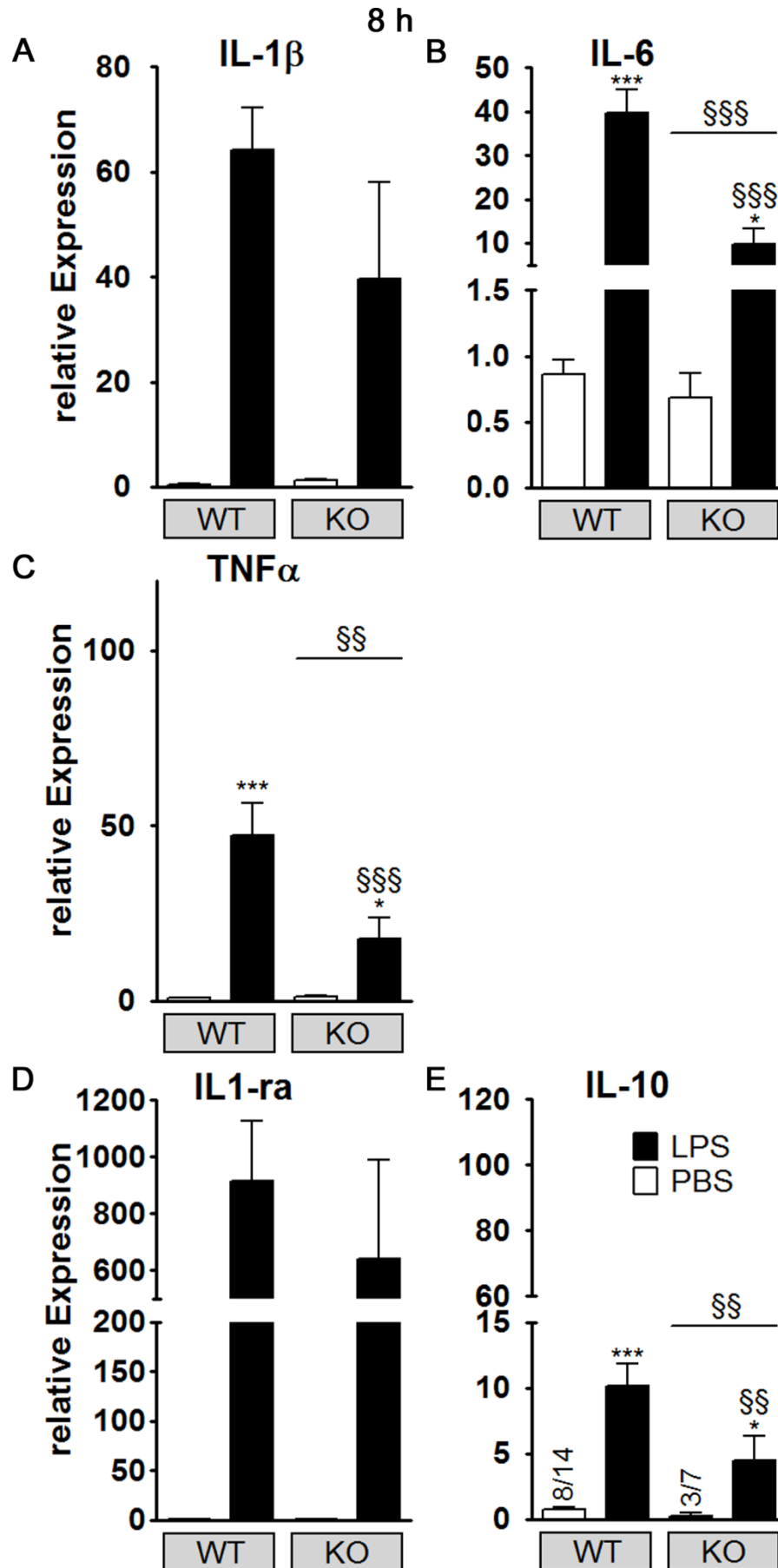


Abbildung III-8

Hypothalamische Expression der pro-inflammatorischen Zytokine Interleukin (IL)-1 β (A), IL-6 (B) und Tumornekrosefaktor (TNF) α (C), sowie der anti-inflammatorischen Mediatoren IL-1-Rezeptor-Antagonist (ra; D) und IL-10 (E) 8 h nach Stimulation mit „phosphate-buffered saline“ (PBS) oder 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS). Der LPS-induzierte Anstieg der Expression von IL-6, TNF α und IL-10 ist in den KO signifikant niedriger als in den WT. § Haupteffekt Genotyp, § KO vs. WT, * LPS vs. PBS, 8/14 = 8 von 14 Proben waren detektierbar

24 h nach der LPS-Stimulation war die Expression von IL-1 β (Abbildung III-9, A, Haupteffekt Behandlung $p = 0,0006$), TNF α (C, Haupteffekt Behandlung $p < 0,0001$), IL-1ra (D, Haupteffekt Behandlung $p < 0,0001$) und IL-10 (E, Haupteffekt Behandlung $p = 0,0001$) noch leicht gegenüber den Kontrolltieren erhöht, während die Expression von IL-6 in den WT bereits wieder basale Werte erreicht hatte. Alle untersuchten Zytokine waren zu diesem Zeitpunkt jedoch in den KO gegenüber den WT erhöht exprimiert (IL-6 *post-hoc* $p < 0,05$; alle anderen *post-hoc* $p < 0,001$).

Zusammenfassend zeigten die KO also im Vergleich zu den WT 8 h nach LPS-Behandlung verminderte, 24 h nach LPS-Behandlung jedoch erhöhte hypothalamische Expression verschiedener inflammatorischer Mediatoren.

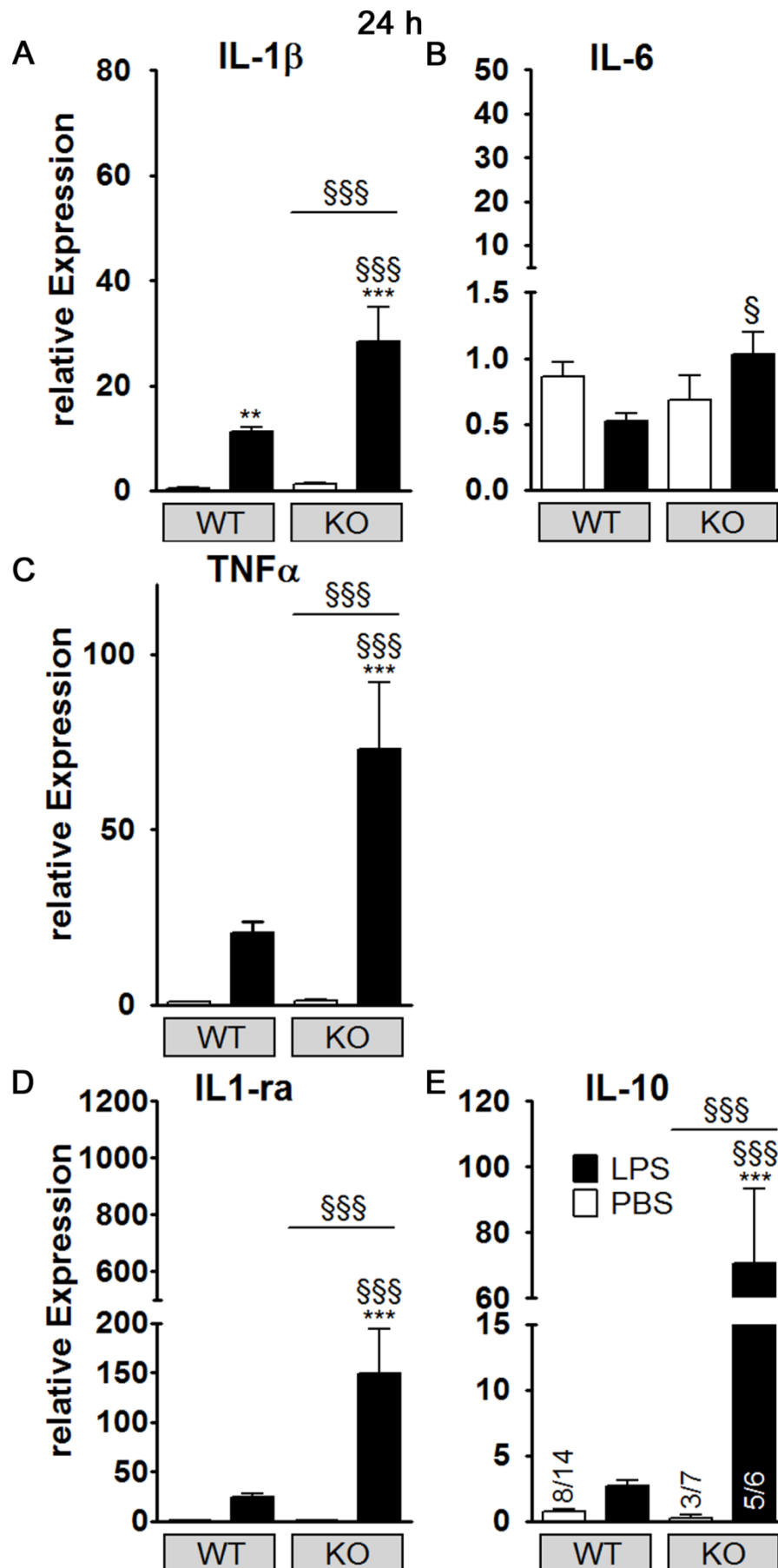


Abbildung III-9

Hypothalamische Expression der pro-inflammatorischen Zytokine Interleukin (IL)-1 β (A), IL-6 (B) und Tumornekrosefaktor (TNF) α (C), sowie der anti-inflammatorischen Mediatoren IL-1-Rezeptor-Antagonist (ra; D) und IL-10 (E) 24 h nach Stimulation mit „phosphate-buffered saline“ (PBS) oder 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS). 24 h nach LPS-Stimulation zeigten die KO deutlich erhöhte Expression der Zytokine, während die Zytokin-Expression der WT bereits wieder basale Level erreicht hatte. § Haupteffekt Genotyp, § KO vs. WT, * LPS vs. PBS, 8/14 = 8 von 14 Proben waren detektierbar

2.3 Transkriptionsfaktoren

Um den Einfluss von NF-IL6 auf andere, für die Kommunikation zwischen Immunsystem und Gehirn wichtige Transkriptionsfaktoren zu untersuchen, wurde die hypothalamische Expression von SOCS3 (Abbildung III-10 A) als Inhibitor und gleichzeitig als Aktivitätsmarker von STAT3 (siehe auch Kapitel I.2.1.4.2) sowie I κ B α (B) als Inhibitor sowie Aktivitätsmarker von NF κ B (siehe auch Kapitel I.2.1.4.1) analysiert. Beide zeigten 8 h nach LPS-Stimulation eine erhöhte hypothalamische Expression. Diese Erhöhung war in den KO gegenüber den WT jedoch signifikant vermindert (beide *post-hoc* $p < 0,01$).

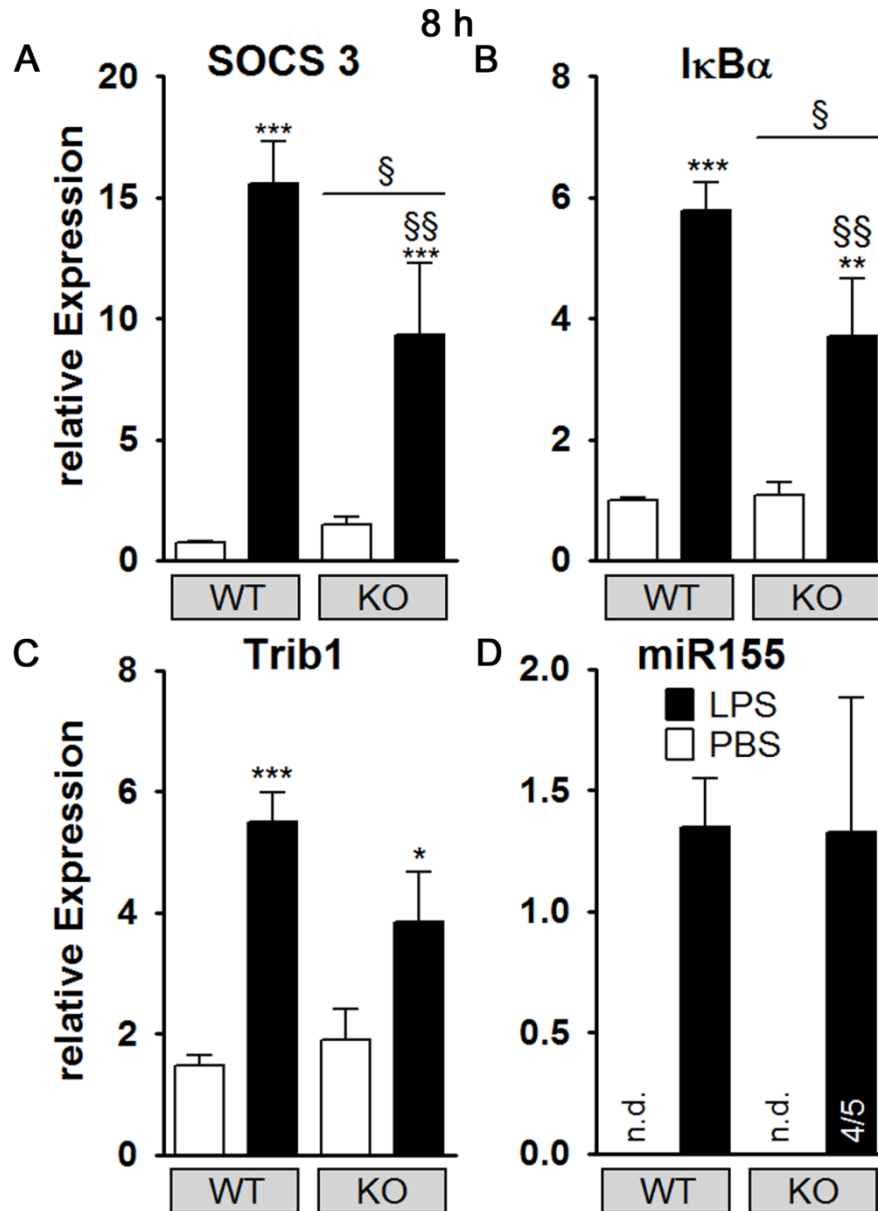


Abbildung III-10

Hypothalamische Expression von „suppressor of cytokine signaling“ (SOCS)3 (A) als Aktivitätsmarker für „signal transducer and activator of transcription“ (STAT)3 und „Inhibitor of κ B“ (I κ B) α (B) als Aktivitätsmarker für NF κ B, sowie der Regulatoren der NF-IL6-Aktivität Trib1 (C) und micro RNA (miR)155 (D). Alle zeigten erhöhte Expression 8 h nach Lipopolysaccharid (LPS)-Stimulation. In den KO war dieser Anstieg der Expression von SOCS3 und I κ B α jedoch geringer als in den WT. PBS = „phosphate-buffered saline“. § Haupteffekt Genotyp, § KO vs. WT, * LPS vs. PBS, 4/5 = 4 von 5 Proben waren detektierbar, n.d. = nicht detektierbar

Anschließend wurde mittels Immunfluoreszenz verifiziert, dass die Veränderungen der hypothalamischen SOCS3-Expression auch mit Veränderungen der STAT3-Menge im Gewebe einher gehen (Abbildung III-11). Dabei wurden im OVLT bzw. in daran angrenzenden Gewebeschnitten (A) von PBS-behandelten WT und KO keine STAT3-Signale (grün) nachgewiesen. In LPS-behandelten WT wurden zahlreiche, starke nukleäre Signale detektiert, während in KO deutlich weniger Signale dargestellt werden konnten. In (B) ist die semiquantitative Evaluierung dieser Ergebnisse dargestellt, welche die Ergebnisse der SOCS3-PCR bestätigen.

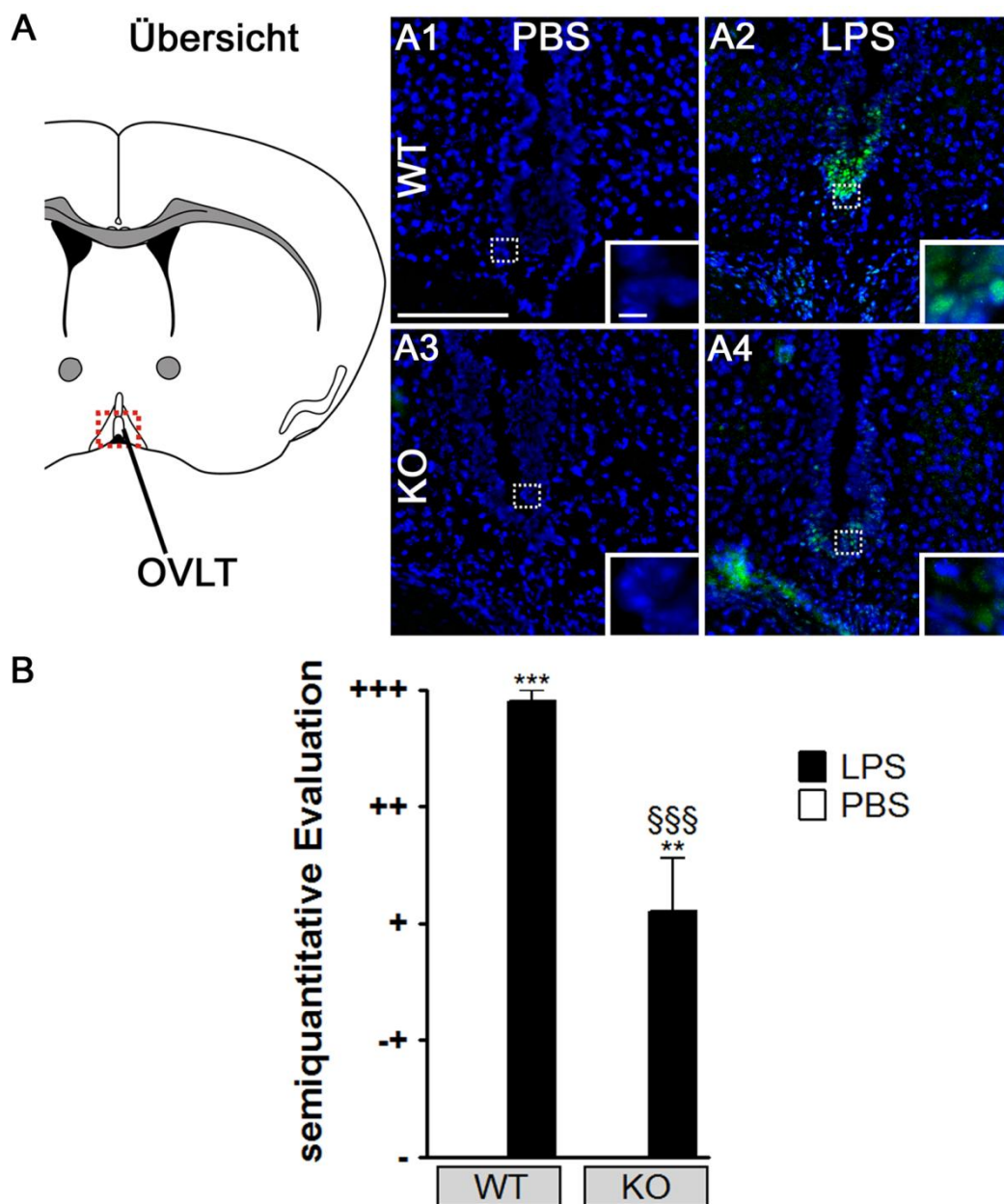


Abbildung III-11

Nachweis von „signal transducer and activator of transcription“ (STAT)3 mittels Immunfluoreszenz in Gewebeschnitten, angrenzend an das *organum vasculosum lamina terminalis* (leicht caudal des OVLT, A). Zellkerne sind in blau dargestellt. „phosphate-buffered saline“ (PBS)-behandelte WT (A1) und KO (A3) zeigten keine STAT3-Signale (grün). Lipopolysaccharid (LPS)-behandelte WT (A2) wiesen zahlreiche nukleäre STAT3-Signale auf, während deren Anzahl in KO (A4) deutlich reduziert war. (B) zeigt die semiquantitative Evaluierung dieser Ergebnisse. § KO vs. WT, * LPS vs. PBS, Scale Bar in A1 = 100 µm – repräsentativ für A1-A4; Scale Bar im Inset = 5 µm - repräsentativ für alle Insets

Auch NF-IL6 wurde mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen (Abbildung III-12). In WT wurden 8 h nach LPS-Injektion vermehrt NF-IL6-Signale in den untersuchten Gehirnstrukturen SFO und PVN gefunden. In den Gehirnen der KO waren keine NF-IL6-Signale nachweisbar, wodurch zugleich der Gen-Knockout bestätigt wurde.

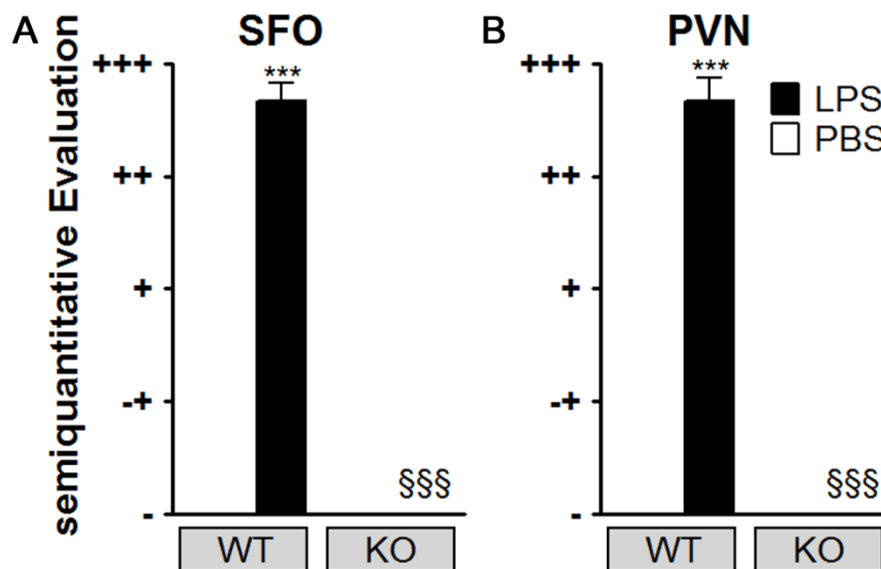


Abbildung III-12

Semiquantitative Evaluation der Immunfluoreszenz für NF-IL6 des *organum subfornicale* (SFO, A) und des *nucleus paraventricularis* (PVN, B). Die WT zeigten in beiden Regionen stark erhöhte NF-IL6-Signale nach Lipopolysaccharid (LPS)-Stimulation. In den KO waren keine Signale detektierbar. PBS = „phosphate-buffered saline“. § KO vs. WT, * LPS vs. PBS

Des Weiteren wurde die hypothalamische Expression von Trib1 und miR155 (Abbildung III-10, C und D) analysiert, die beide Regulatoren der NF-IL6-Aktivität sind (siehe auch Kapitel I.3.4). Beide waren 8 h nach LPS-Stimulation erhöht

exprimiert, es war jedoch kein Unterschied zwischen den beiden Genotypen feststellbar.

24 h nach der LPS-Stimulation war die SOCS3-Expression (Abbildung III-13, A, Haupteffekt Behandlung $p < 0,0001$) sowie die I κ B α -Expression (B, Haupteffekt Behandlung $p < 0,0001$) in den WT noch geringgradig gegenüber den PBS-behandelten Kontrollen erhöht. Die KO hingegen zeigten bei beiden eine gegenüber den WT signifikant erhöhte Expression (SOCS3: *post-hoc* $p < 0,001$; I κ B α Haupteffekt Genotyp $p < 0,05$). Trib1 (C) wies 24 h nach der Behandlung keine Änderungen der Expression auf, während miR155 (D) in den LPS-behandelten KO gegenüber den WT leicht erhöht war (*post-hoc* $p < 0,05$).

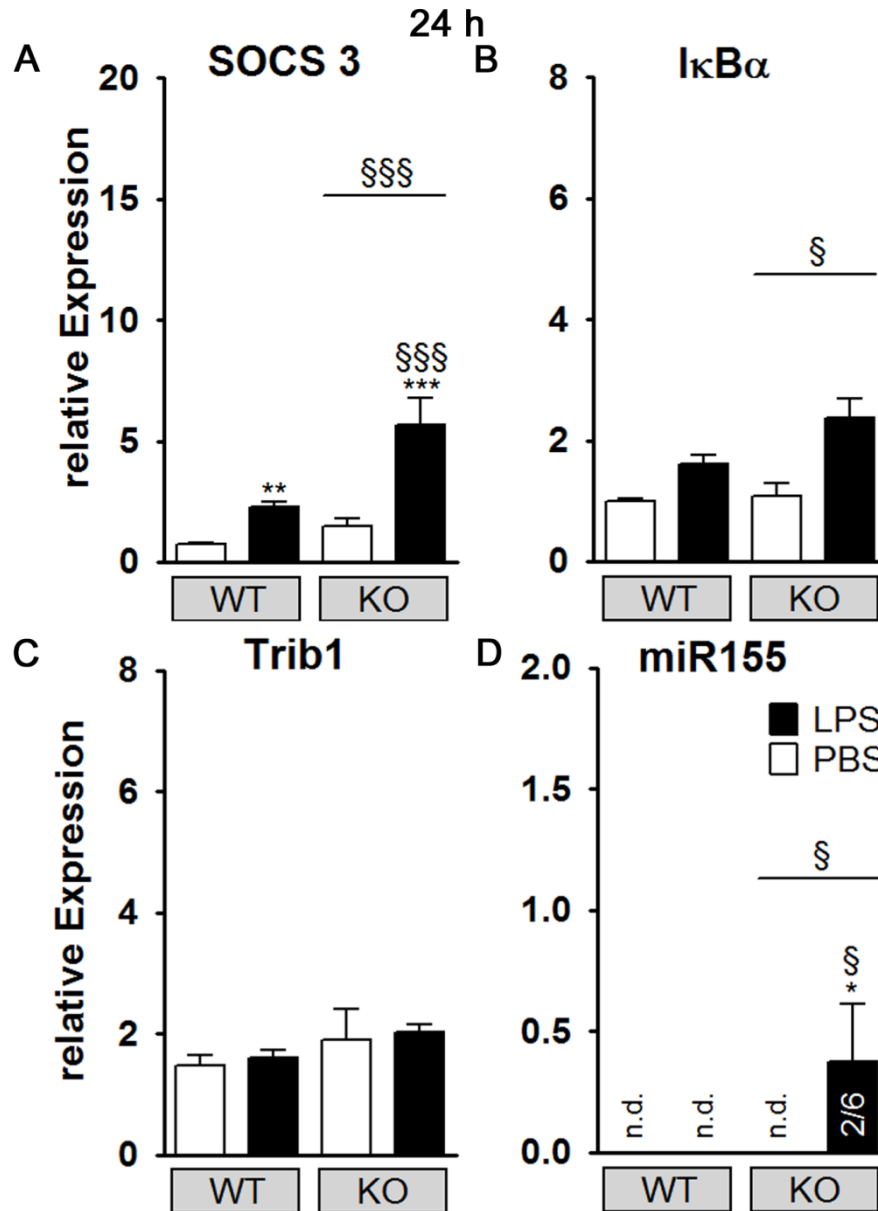


Abbildung III-13

Hypothalamische Expression von „suppressor of cytokine signaling“ (SOCS)3 (A) als Aktivitätsmarker für „signal transducer and activator of transcription“ (STAT)3 und „Inhibitor of κ B“ (I κ B) α (B) als Aktivitätsmarker für NF κ B, sowie der Regulatoren der NF-IL6-Aktivität Trib1 (C) und micro RNA (miR)155 (D). SOCS3 und I κ B α zeigten 24 h nach Lipopolysaccharid (LPS)-Injektion gegenüber den WT erhöhte Expression. Trib1-Expression war unverändert, während miR155 in LPS-behandelten KO verstärkt exprimiert war. PBS = „phosphate-buffered saline“. § Haupteffekt Genotyp, § KO vs. WT, * LPS vs. PBS, 2/6 = 2 von 6 Proben waren detektierbar, n.d. = nicht detektierbar

Der Nachweis von NF-IL6 mittels Immunfluoreszenz (Abbildung III-14) in verschiedenen Gehirnregionen ergab in den WT 24 h nach LPS-Behandlung vermehrte Signale; allerdings weniger als 8 h nach Stimulation. In den KO waren auch hier keine Signale nachweisbar.

Auch bei den untersuchten Transkriptionsfaktoren zeigten die KO also 8 h nach LPS-Stimulation eine gegenüber den WT verminderte Expression, 24 h nach LPS-Stimulation jedoch eine erhöhte Expression.

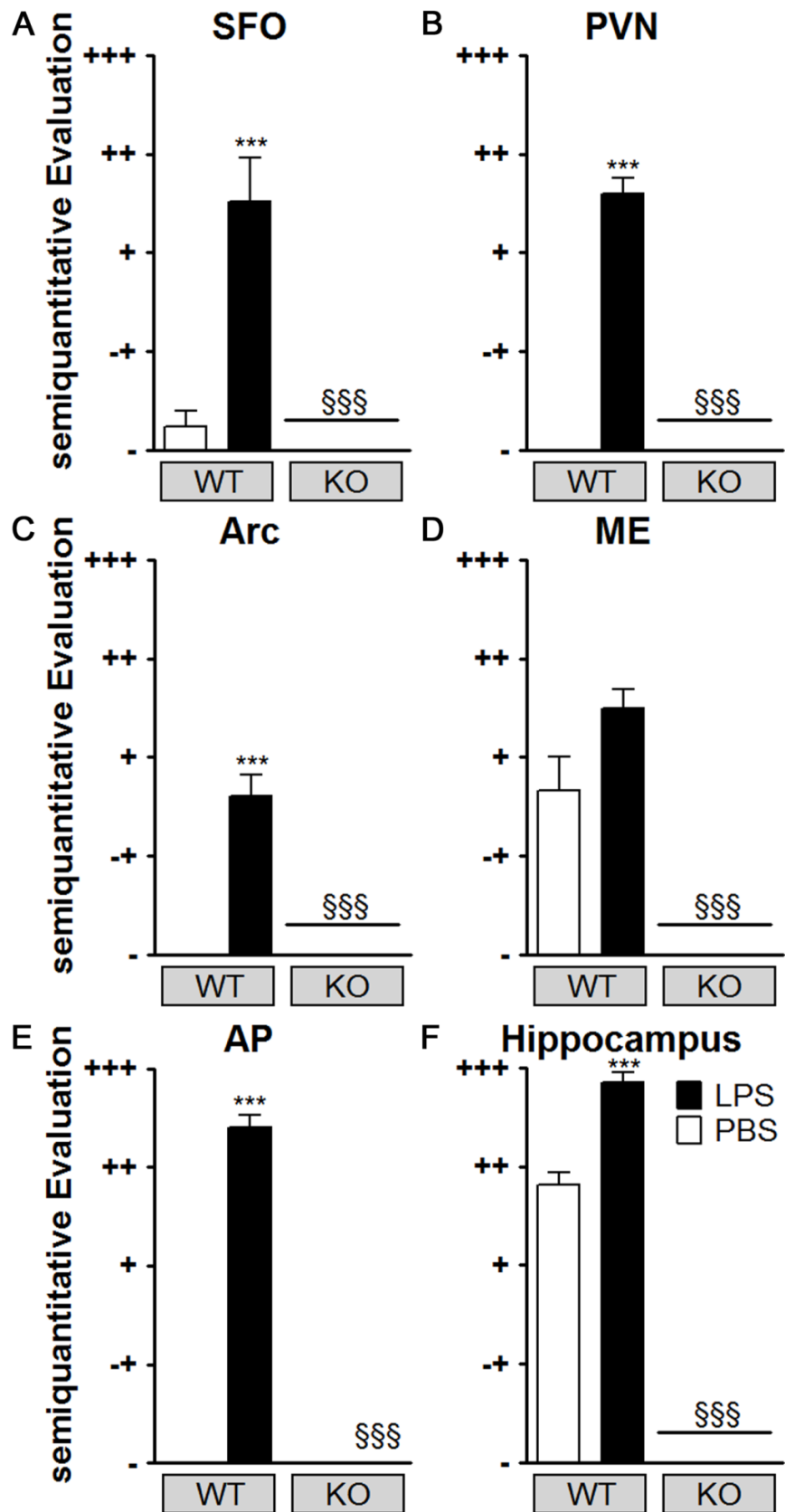


Abbildung III-14

Semiquantitative Evaluation der Immunfluoreszenz für NF-IL6 in den Gehirnregionen *organum subfornicale* (SFO, A), *nucleus paraventricularis* (PVN, B), *nucleus arcuatus* (Arc, C), *eminencia*

mediana (ME, D), *area postrema* (AP, E) und *Hippocampus* (F). SFO, PVN, Arc, AP und *Hippocampus* zeigten in WT 24 h nach Lipopolysaccharid (LPS)-Stimulation erhöhte NF-IL6-Signale. In KO waren keine Signale nachweisbar. PBS = „phosphate-buffered saline“. § Haupteffekt Genotyp, § KO vs. WT, * LPS vs. PBS

2.4 Zielgene

Als bei der Entstehung der „sickness response“ wichtige Zielgene wurden die beiden geschwindigkeitsbestimmenden Enzyme der PGE₂-Synthese untersucht: COX2 (Abbildung III-15, A) und mPGES (B). COX2 war im Hypothalamus 8 h nach LPS-Stimulation in beiden Genotypen erhöht exprimiert (Haupteffekt Behandlung $p < 0,0001$).

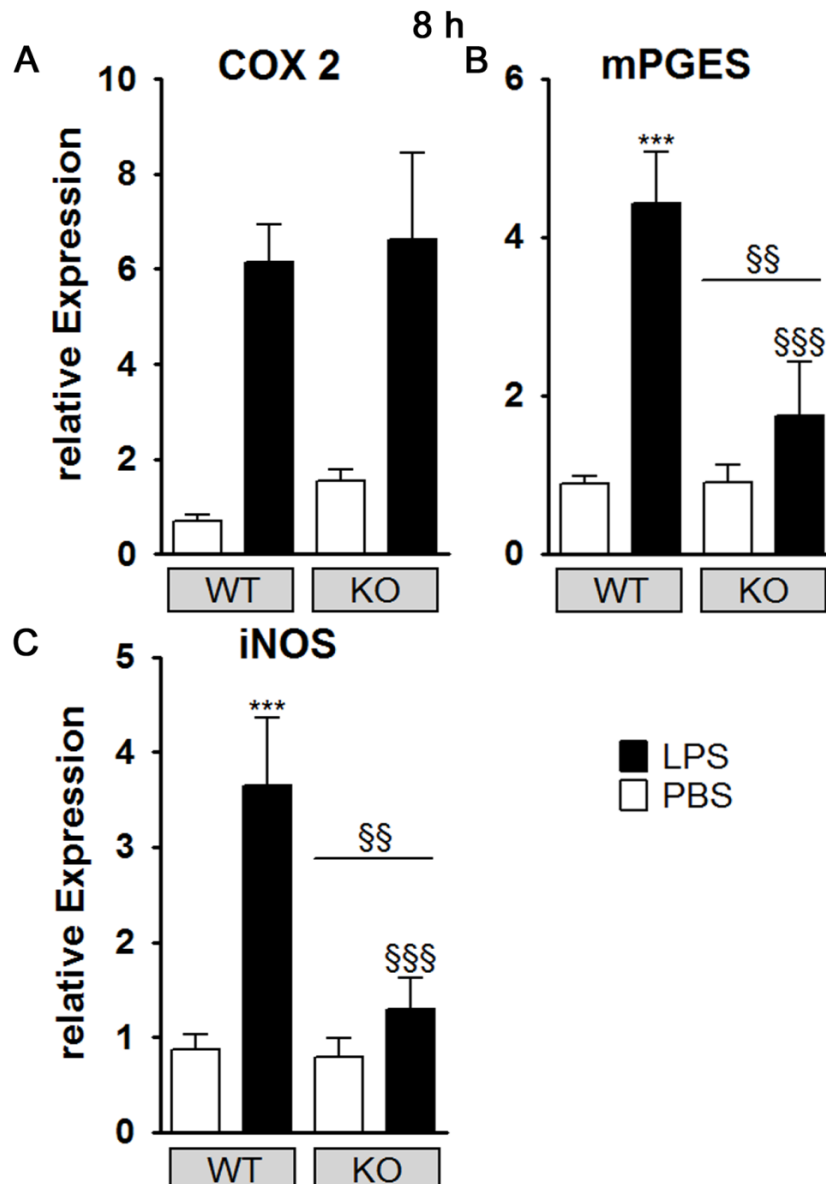


Abbildung III-15

Hypothalamische Expression der Cyclooxygenase (COX)2 (A), mikrosomalen Prostaglandin E Synthase (mPGES, B) sowie der induzierbaren „nitric oxide“ Synthase (iNOS, C) 8 h nach der Behandlung mit „phosphate-buffered saline“ (PBS) oder 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS). WT zeigten 8 h nach LPS-Stimulation eine erhöhte Expression dieser Gene, während in KO kein Anstieg der Expression von mPGES und iNOS detektierbar war. § Haupteffekt Genotyp, § KO vs. WT, * LPS vs. PBS

Mittels Immunfluoreszenz (Abbildung III-16) wurde zusätzlich COX2 (rot) im MnPO nachgewiesen. Dabei zeigten WT 8 h nach der LPS-Behandlung einen starken Anstieg der COX2-Signale, während dieser Anstieg bei den KO etwas geringer ausfiel (*post-hoc* $p < 0,01$).

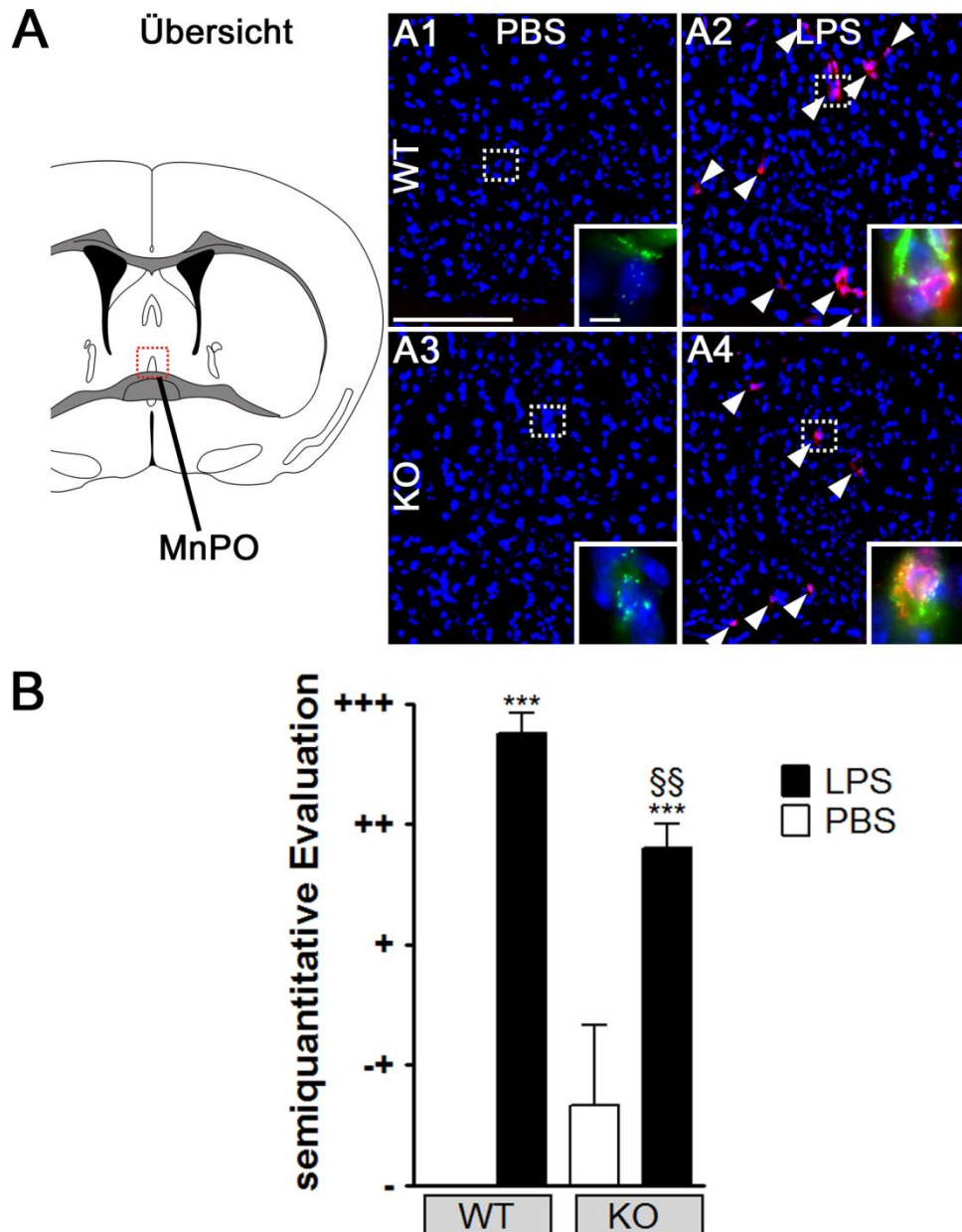


Abbildung III-16

Nachweis der Cyclooxygenase (COX)2 mittels Immunfluoreszenz des *nucleus praeopticus medianus* (MnPO, A). Zellkerne sind in blau dargestellt. 8 h nach „phosphate-buffered saline“ (PBS)-Behandlung sind in WT (A1) und KO (A3) keine COX2-Signale (rot) detektierbar. 8 h nach Lipopolysaccharid (LPS)-Behandlung zeigten die WT (A2) vermehrt COX2-Signale. Die KO (A4) wiesen ebenfalls vermehrt Signale auf, jedoch weniger als die WT. Die COX2-Signale waren Gefäß-assoziiert (Inset: Marker für Blutgefäße = von Willebrandt Faktor, grün). (B) zeigt die semiquantitative Evaluation der Immunfluoreszenz. § KO vs. WT, * LPS vs. PBS, Scale Bar in A1 = 100 μ m – repräsentativ für A1-A4; Scale Bar im Inset = 5 μ m - repräsentativ für alle Insets

Im Hypothalamus der WT war mPGES (Abbildung III-15, B) 8 h nach LPS-Stimulation erhöht exprimiert. Die KO hingegen zeigten keine LPS-induzierte Erhöhung der mPGES-Expression (*post-hoc* $p < 0,001$). Dies deutet darauf hin, dass die PGE₂-Synthese in KO 8 h nach LPS-Stimulation reduziert sein könnte, was eine mögliche Erklärung für das beobachtete reduzierte Fieber darstellt. Auch die iNOS (C), die eine Rolle für LPS-induzierte Anorexie und Lethargie sowie für die Modulation der Fieberantwort spielt (siehe auch Kapitel I.2.1.5.2), wies in den KO keinen LPS-induzierten Anstieg der Expression wie in den WT auf (*post-hoc* $p < 0,001$).

24 h nach LPS-Injektion war die Expression der COX2 (Abbildung III-17, A), mPGES (B) und der iNOS (C) im Vergleich zu den Kontrollen noch leicht erhöht (Haupteffekt Behandlung COX2 $p < 0,0001$; mPGES $p = 0,0004$; iNOS $p = 0,0257$). Die Expression der COX2 war dabei in den KO gegenüber den WT erhöht (Haupteffekt Genotyp $p < 0,0001$). Die Expression der mPGES und der iNOS ergab keine Veränderungen zwischen den beiden Genotypen.

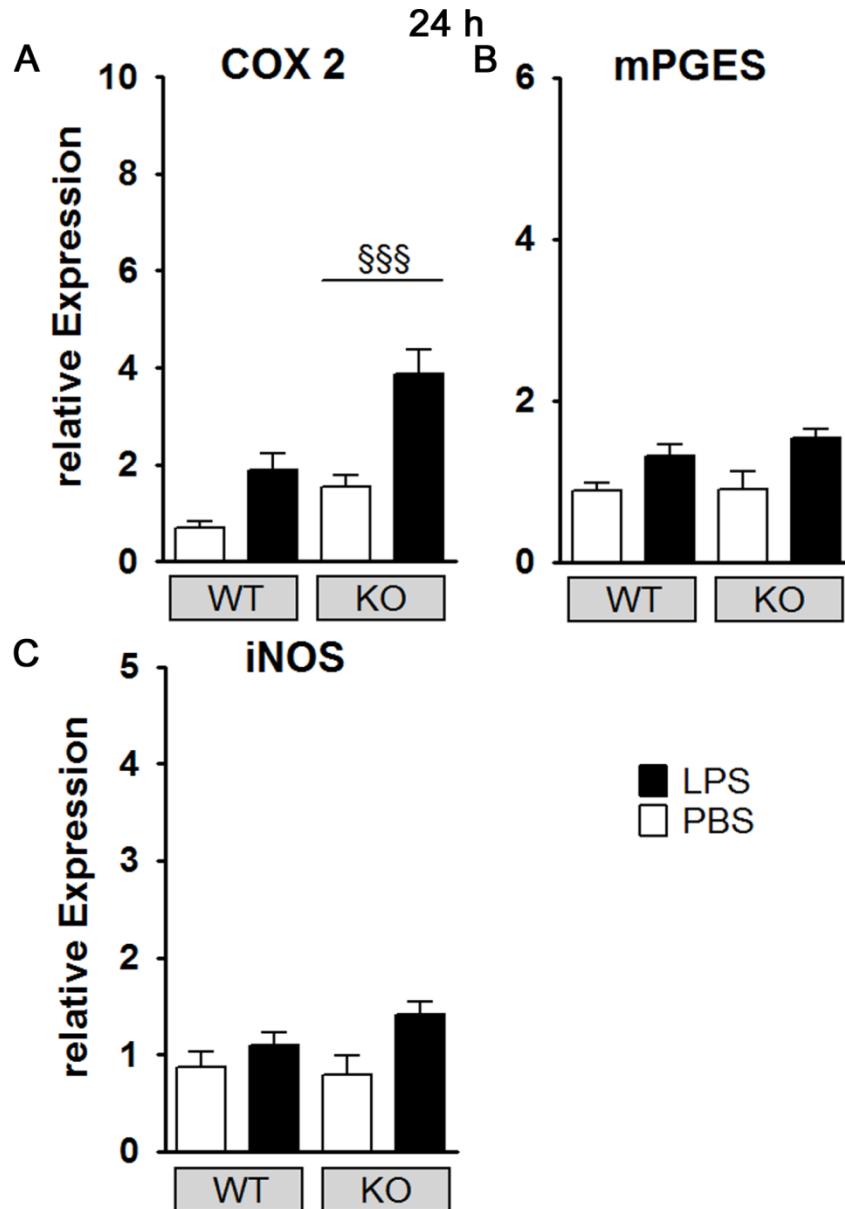


Abbildung III-17

Hypothalamische Expression der Cyclooxygenase (COX)2 (A), mikrosomalen Prostaglandin E Synthase (mPGES, B) sowie der induzierbaren „nitric oxide“ Synthase (iNOS, C) 24 h nach Behandlung mit „phosphate-buffered saline“ (PBS) oder 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS). KO zeigten gegenüber WT erhöhte Expression der COX2. Expression der mPGES und der iNOS waren unverändert. § Haupteffekt Genotyp

Nachweis der COX2 mittels Immunfluoreszenz des MnPO (Abbildung III-18) ergab anschließend ebenfalls vermehrte COX2-Signale 24 h nach LPS-Behandlung (A2, A4) gegenüber den PBS-behandelten Kontrollen (A1, A3) in beiden Genotypen. Ähnlich wie in der PCR des Hypothalamus waren auch hier die COX2-Signale in den KO

gegenüber den WT vermehrt (Haupteffekt Genotyp $p < 0,05$). 24 h nach der LPS-Injektion scheinen die KO also eher eine erhöhte PGE₂-Synthese aufzuweisen.

Zusammenfassend zeigten die KO also auch auf Ebene der inflammatorischen Zielgene eine im Vergleich zu den WT verminderte Expression 8 h nach LPS-Stimulation, jedoch eine erhöhte Expression 24 h nach LPS-Stimulation.

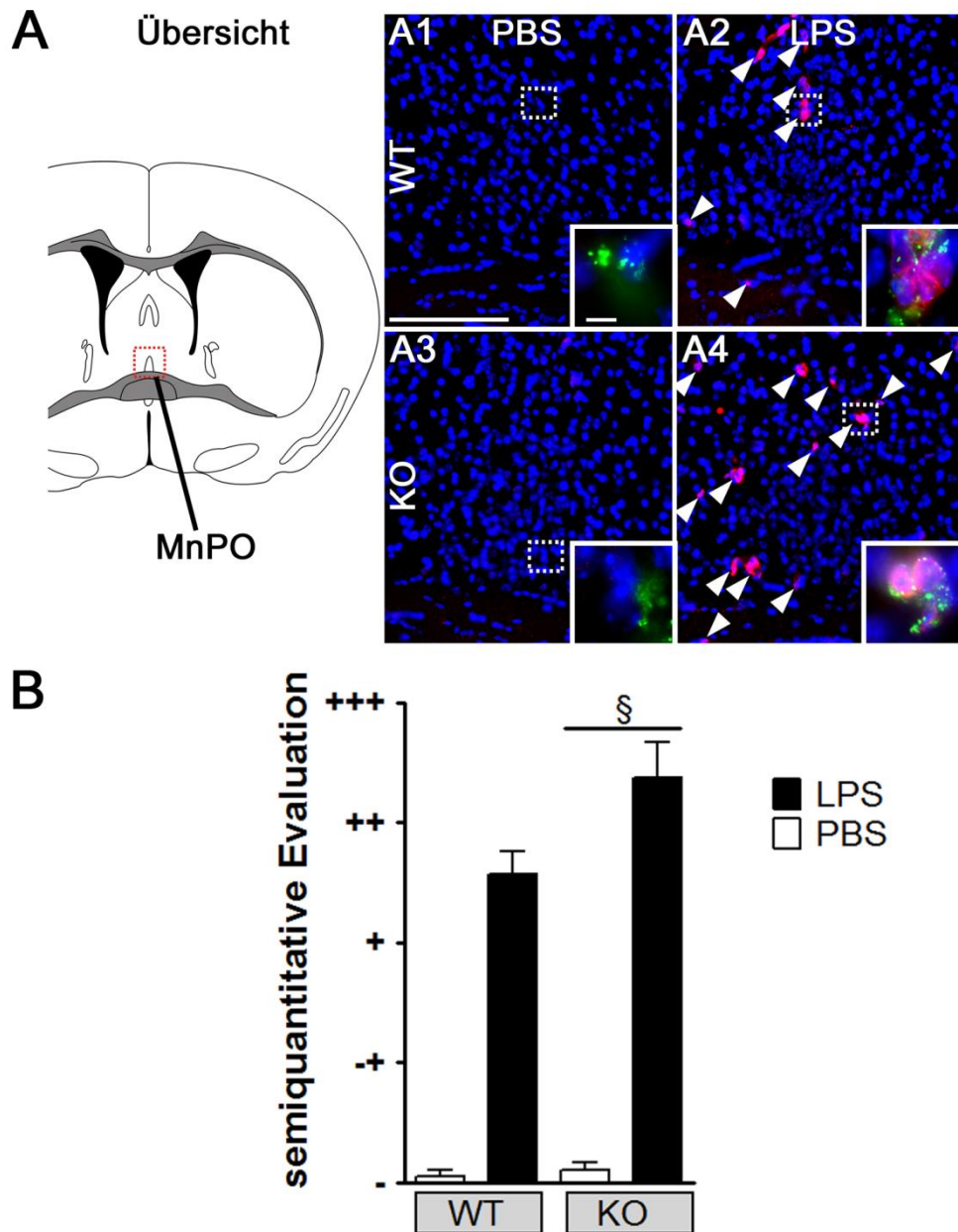


Abbildung III-18

Nachweis der Cyclooxygenase (COX)2 mittels Immunfluoreszenz des *nucleus praeopticus medianus* (MnPO, A). Zellkerne sind in blau dargestellt. 24 h nach „phosphate-buffered saline“ (PBS)-Behandlung sind in WT (A1) und KO (A3) keine COX2-Signale (rot) detektierbar. 24 h

nach Lipopolysaccharid (LPS)-Behandlung zeigten WT (A2) und KO (A4) vermehrt COX2-Signale, wobei die Anzahl der Signale in KO höher war als in WT. Die COX2-Signale waren Gefäß-assoziiert (Inset: Marker für Blutgefäße = von Willebrandt Faktor, grün). (B) zeigt die semiquantitative Evaluation der Immunfluoreszenz. § Haupteffekt Genotyp, Scale Bar in A1 = 100 µm – repräsentativ für A1-A4; Scale Bar im Inset = 5 µm - repräsentativ für alle Insets

3. Beeinflussung des zellulären Kommunikationswegs zum Gehirn durch NF-IL6

Um zu untersuchen, wie NF-IL6 die Migration von Immunzellen zum Gehirn beeinflusst, wurde zunächst die hypothalamische Expression verschiedener Zellmarker analysiert (Abbildung III-19). Als Marker für die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten wurde dabei CXCL1 verwendet. Dies ist ein Chemokin, das z. B. nach Stimulation des TLR4 oder nach Stimulation mit inflammatorischen Zytokinen von Mastzellen, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten gebildet und freigesetzt wird und eine Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in das entzündete Gewebe bewirkt (Gasperini et al. 1995; De Filippo et al. 2013). 8 h nach LPS-Injektion zeigten WT und KO erhöhte hypothalamische Expression von CXCL1 (A, Haupteffekt Behandlung $p < 0,0001$). Die KO wiesen jedoch gegenüber den WT verminderte CXCL1-Expression auf (*post-hoc* $p < 0,001$). Dieses Ergebnis deutete also auf eine verminderte LPS-induzierte Einwanderung neutrophiler Granulozyten ins Gehirn der KO 8 h nach LPS-Stimulation hin. 24 h nach LPS-Stimulation war bei beiden Genotypen erhöhte CXCL1-Expression im Hypothalamus festzustellen (Haupteffekt Behandlung $p < 0,0001$), wobei die Expression in den KO geringgradig gegenüber den WT erhöht war (Haupteffekt Genotyp $p = 0,0259$).

Als Zellmarker für aktivierte Mikroglia diente CD68, das in aktivierten Zellen vermehrt exprimiert wird (Bauer et al. 1994). Beide Genotypen zeigten jedoch keine Veränderungen der CD68-Expression (C, D).

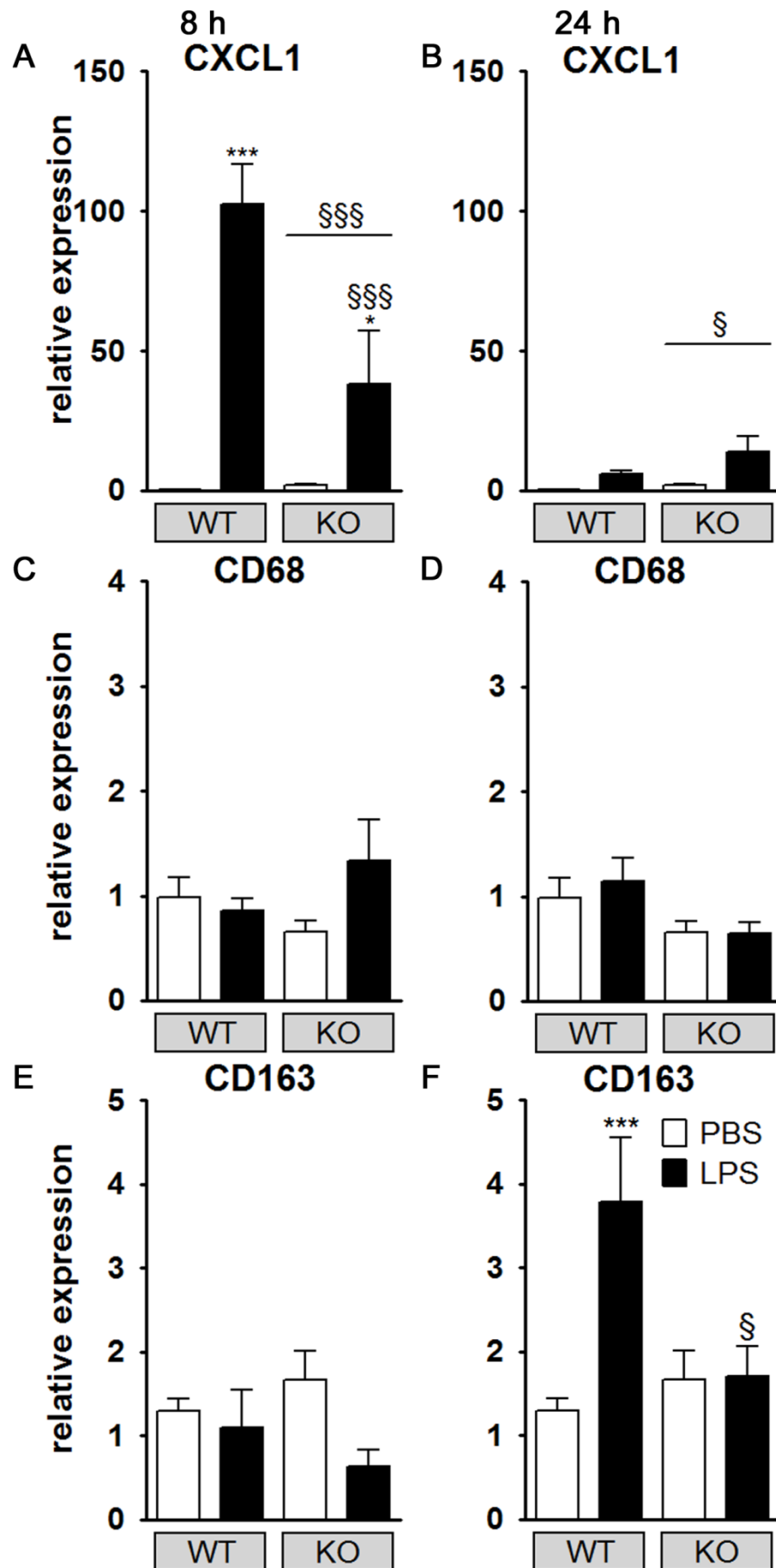


Abbildung III-19

Hypothalamische Expression verschiedener Zellmarker 8 und 24 h nach Stimulation mit „phosphate-buffered saline“ (PBS) oder 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS). CXCL1 (A, B) wurde als Marker für die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten verwendet, CD68 (C, D) für aktivierte Mikroglia und CD163 (E, F) für perivaskuläre Makrophagen. KO zeigten im Vergleich zu WT verminderte CXCL1-Expression 8 h nach LPS-Stimulation jedoch erhöhte CXCL1-Expression nach 24 h sowie verminderte CD163-Expression 24 h nach LPS-Stimulation.

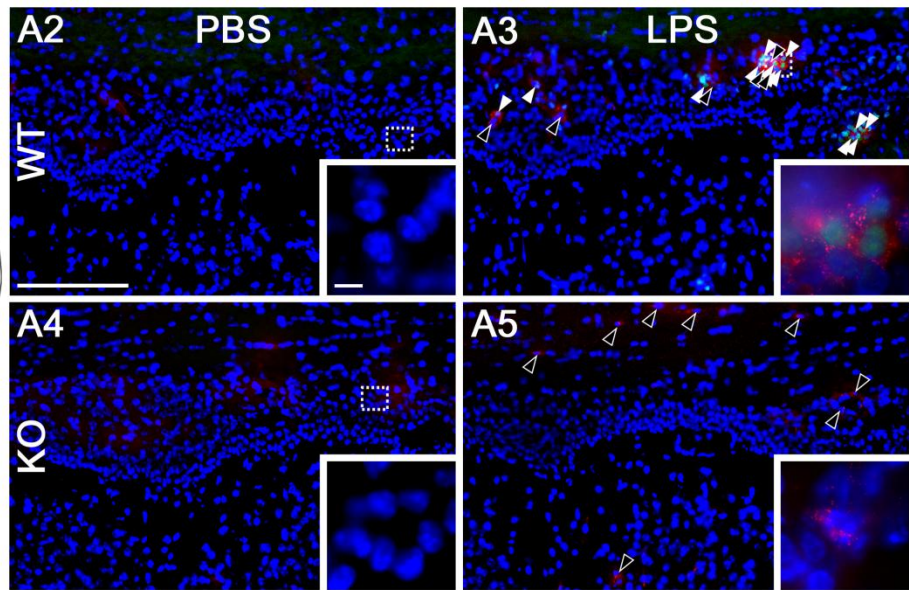
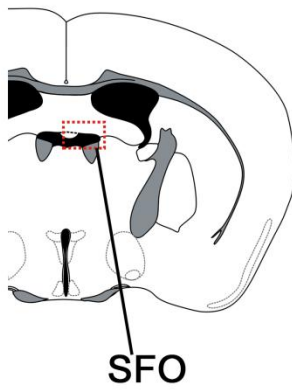
§ Haupteffekt Genotyp, § KO vs. WT, * LPS vs. PBS

Als Marker für perivaskuläre Makrophagen wurde CD163 verwendet (Polfliet et al. 2006). Dieses ergab 8 h nach der Behandlung keine Veränderungen in den beiden Genotypen (E). 24 h nach LPS-Stimulation (F) zeigten die WT eine erhöhte CD163-Expression, nicht jedoch die KO (*post-hoc* $p < 0,05$). Dieses Ergebnis deutete also möglicherweise auf eine reduzierte Anzahl perivaskulärer Makrophagen im Hypothalamus der KO im Vergleich zu WT 24 h nach LPS-Stimulation hin.

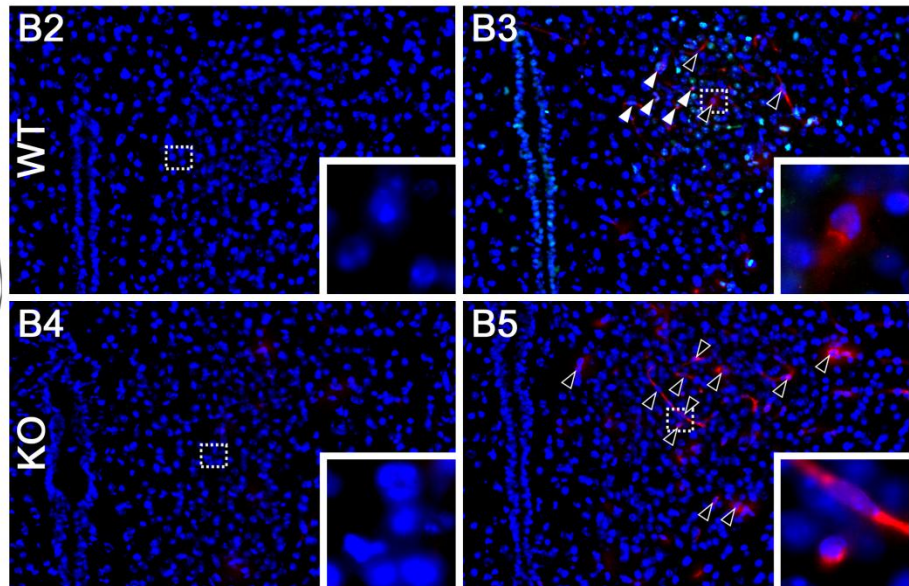
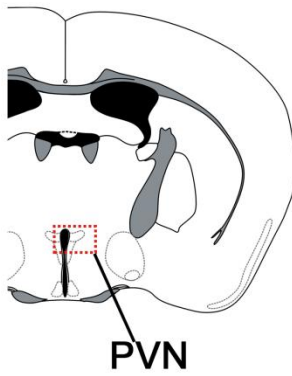
3.1 Neutrophile Granulozyten

Um die Ergebnisse der Analyse der CXCL1-Expression zu verifizieren, wurden Immunfluoreszenz-Analysen durchgeführt (Abbildung III-20). Dazu wurden NG (rot) und NF-IL6 (grün) im SFO (A), PVN (B) und den *fimbria hippocampi* (C) 8 h nach LPS-Stimulation detektiert. Die semiquantitative Evaluierung der Anzahl der NG in diesen Regionen ist in Abbildung III-21 dargestellt. 8 h nach LPS-Injektion zeigten die WT im SFO und im PVN ebenso wie in den *fimbria hippocampi* gegenüber den PBS-behandelten Kontrollen vermehrte NG (Haupteffekt Behandlung, SFO $p < 0,0001$; PVN $p < 0,0001$; *fimbria hippocampi* $p = 0,0158$) und NF-IL6-Signale. Die KO jedoch wiesen im SFO einen deutlich geringeren Anstieg der Anzahl der NG nach LPS-Stimulation auf als die WT (*post-hoc* $p < 0,001$). Im PVN und den *fimbria hippocampi* war kein Unterschied zwischen den beiden Genotypen zu finden.

A1 Übersicht



B1



C1

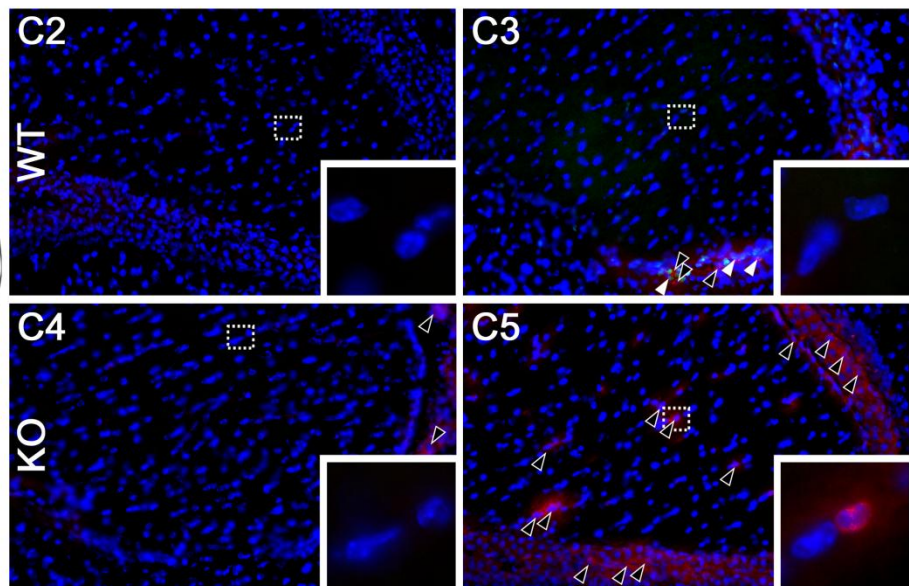
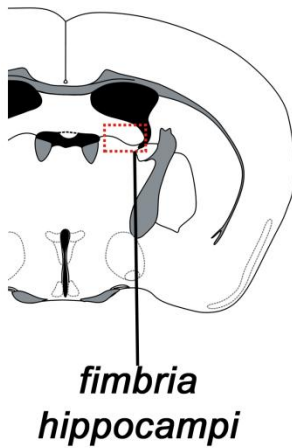


Abbildung III-20

Nachweis von neutrophilen Granulozyten (rot) und NF-IL6 (grün) im *organum subfornicale* (SFO, A), *nucleus paraventricularis* (PVN, B) und *fimbria hippocampi* (C) 8 h nach Stimulation mit „phosphate-buffered saline“ (PBS) oder 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS). Zellkerne sind in blau dargestellt. Im SFO zeigten die WT nach LPS-Stimulation (A3) eine erhöhte Anzahl neutrophiler Granulozyten im Vergleich zu den PBS-behandelten Tieren (A2). Die KO zeigten nach LPS-Stimulation (A5) ebenfalls einen Anstieg gegenüber den PBS-behandelten Tieren (A4), dieser fiel jedoch deutlich geringer aus als in den WT. Im PVN führte LPS-Stimulation in beiden Genotypen (B3, B5) gleichermaßen zu einem Anstieg der neutrophilen Granulozyten gegenüber den Kontrollen (B2, B4). In den *fimbria hippocampi* war ebenfalls in beiden Genotypen eine Zunahme der neutrophilen Granulozyten nach LPS-Stimulation zu detektieren (C3, C5). Scale Bar in A2 = 100 µm – repräsentativ für A2-C5; Scale Bar im Inset = 5 µm - repräsentativ für alle Insets

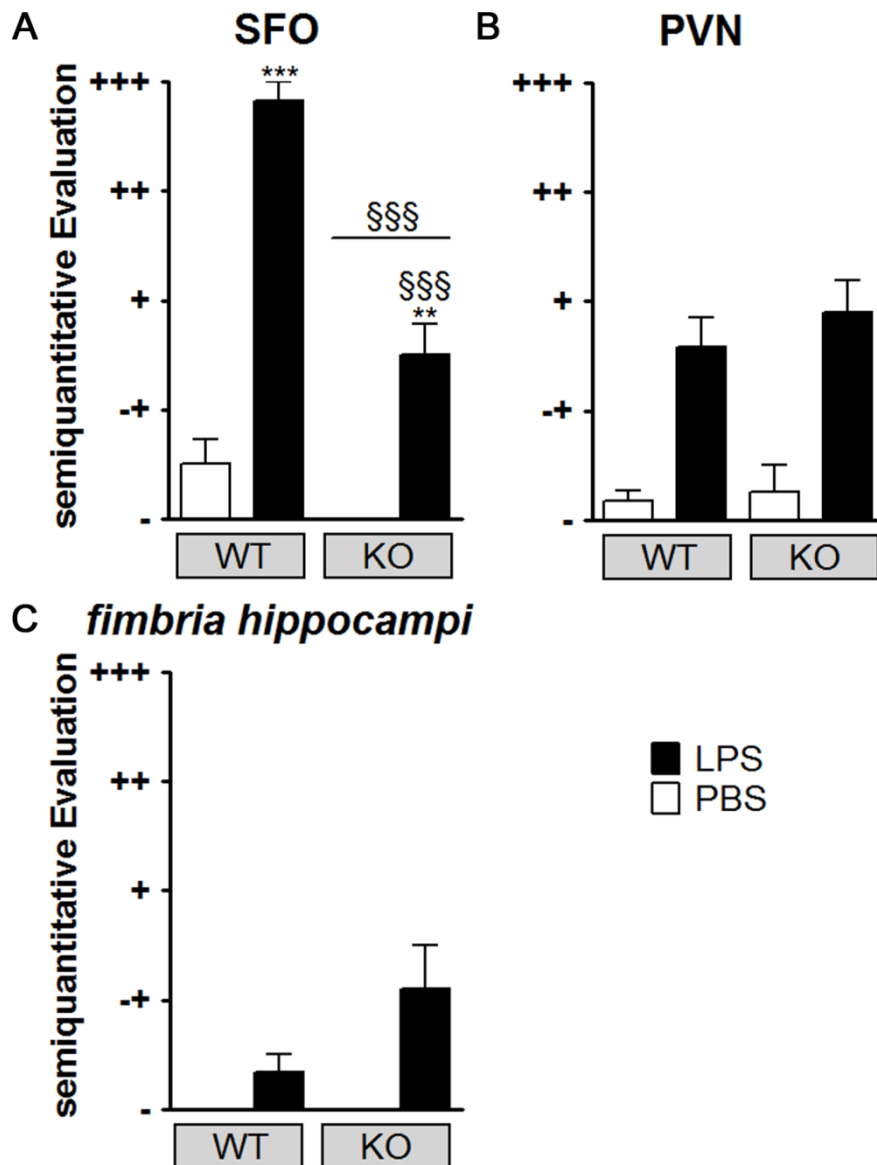


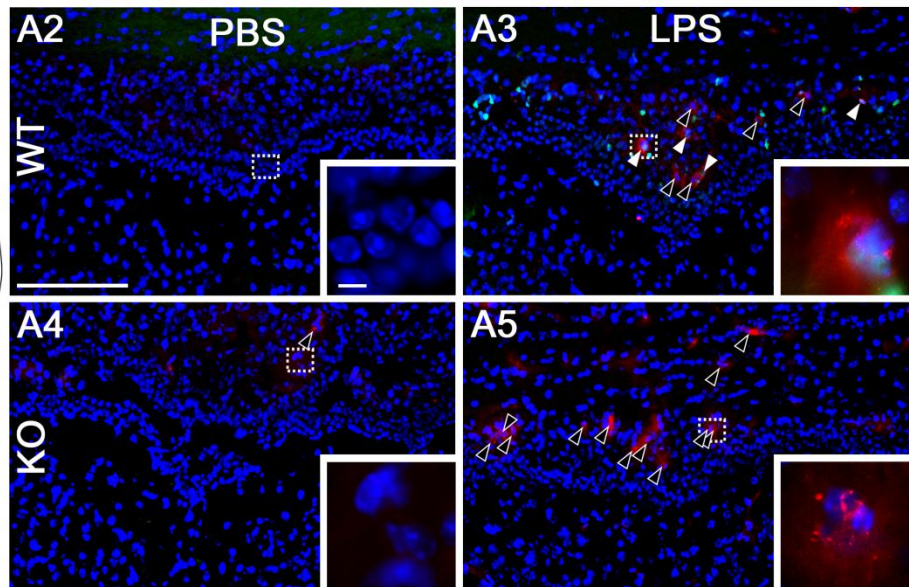
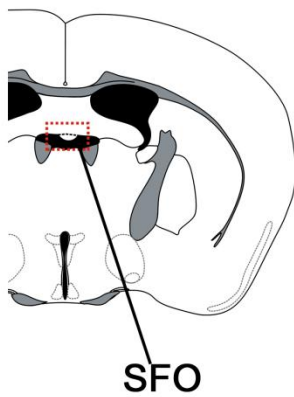
Abbildung III-21

Semiquantitative Evaluation der in der Immunfluoreszenz detektierten neutrophilen Granulozyten 8 h nach Stimulation mit „phosphate-buffered saline“ (PBS) oder 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS) im *organum subfornicale* (SFO, A), *nucleus paraventricularis* (PVN, B) und den *fimbria hippocampi* (C). In allen untersuchten Regionen wurde in beiden Genotypen ein LPS-induzierter Anstieg der Anzahl der neutrophilen Granulozyten festgestellt, im SFO viel dieser in den KO jedoch deutlich geringer aus als in den WT. § Haupteffekt Genotyp, § KO vs. WT, * LPS vs. PBS

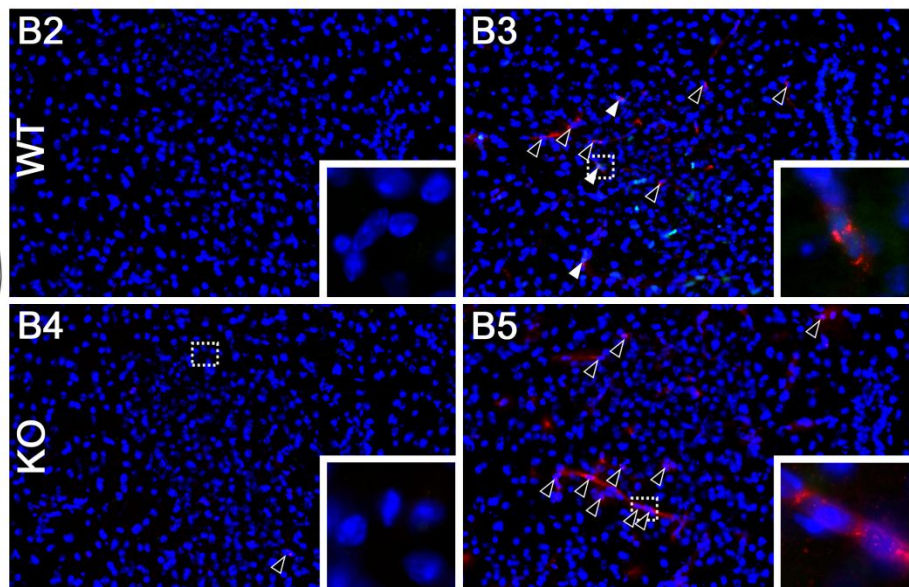
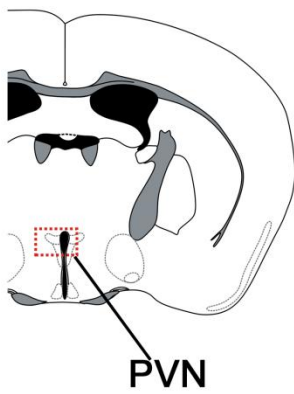
24 h nach LPS-Injektion war die Anzahl der NG in beiden Genotypen in den Regionen SFO (Abbildung III-22, A, Haupteffekt Behandlung $p < 0,0001$), PVN (B, Haupteffekt Behandlung $p < 0,0001$), *fimbria hippocampi* (C, Haupteffekt Behandlung $p < 0,0001$).

0,0001), Arc und ME (Abbildung III-23, A, Haupteffekt Behandlung, Arc $p < 0,0001$; ME $p = 0,0043$), Hippocampus (B, Haupteffekt Behandlung $p < 0,0001$), AP (C, Haupteffekt Behandlung $p < 0,0001$), OVLT (Abbildung III-24, A, Haupteffekt Behandlung $p = 0,0025$) und MnPO (B, Haupteffekt Behandlung $p = 0,0002$) gegenüber den PBS-behandelten Kontrollen erhöht. In den *fimbria hippocampi* war die Anzahl der NG in den KO gegenüber den WT erhöht (*post-hoc* $p < 0,0001$), ansonsten waren zu diesem Zeitpunkt keine Unterschiede zwischen den beiden Genotypen feststellbar.

A1 Übersicht



B1



C1

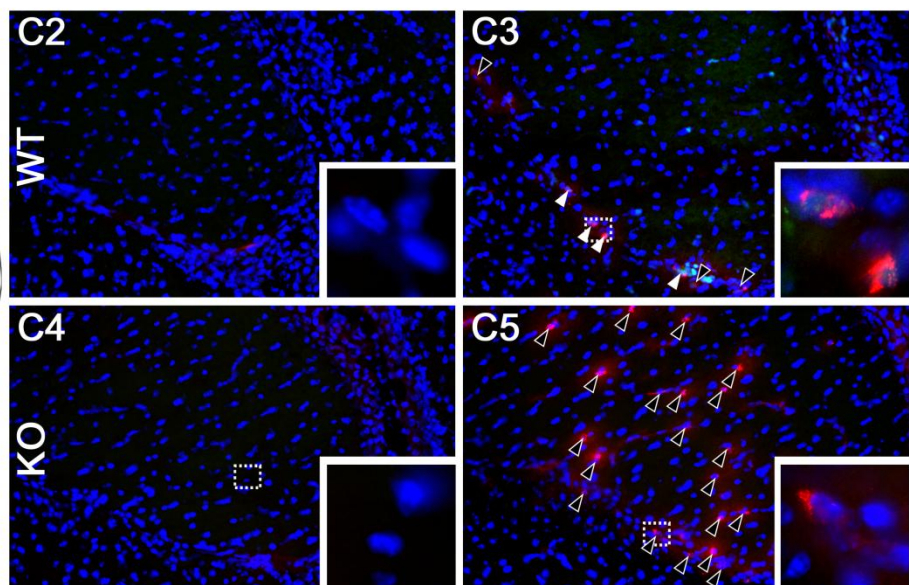
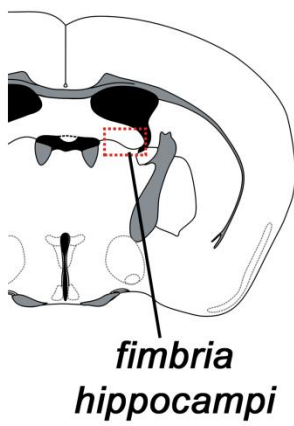
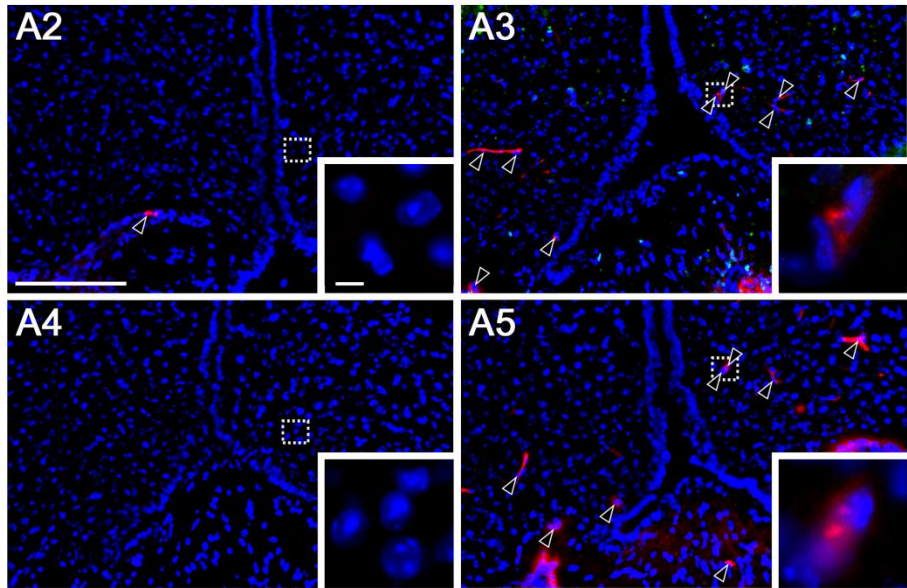
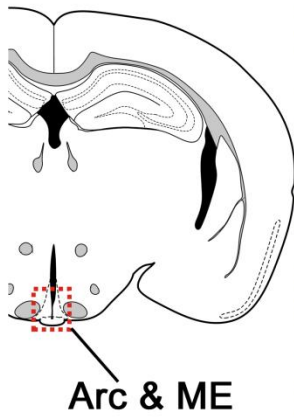


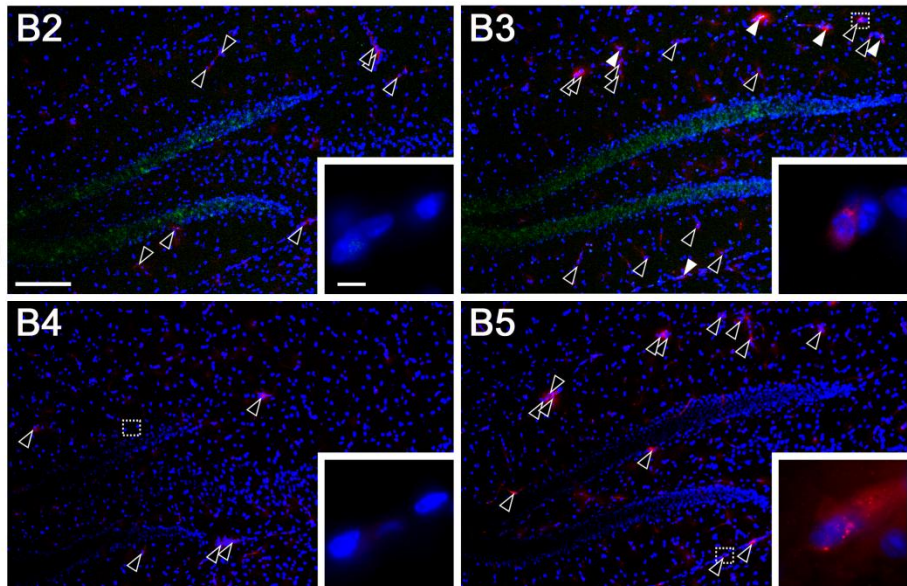
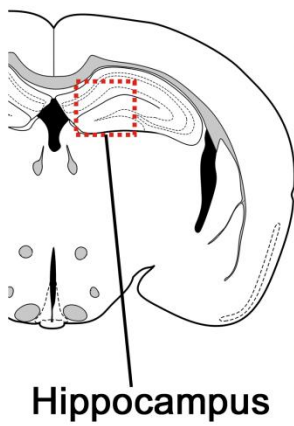
Abbildung III-22

Nachweis von neutrophilen Granulozyten (rot) und NF-IL6 (grün) im *organum subfornicale* (SFO, A), *nucleus paraventricularis* (PVN, B) und *fimbria hippocampi* (C) 24 h nach Stimulation mit „phosphate-buffered saline“ (PBS) oder 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS). Zellkerne sind in blau dargestellt. Im PVN und im SFO zeigten WT und KO gleichermaßen einen LPS-induzierten Anstieg der neutrophilen Granulozyten, während die *fimbria hippocampi* der LPS-behandelten KO (C5) eine deutlich höhere Anzahl neutrophiler Granulozyten aufwies als die LPS-behandelten WT (C3). Scale Bar in A2 = 100 µm – repräsentativ für A2-C5; Scale Bar im Inset = 5 µm - repräsentativ für alle Insets

A1 Übersicht



B1



C1

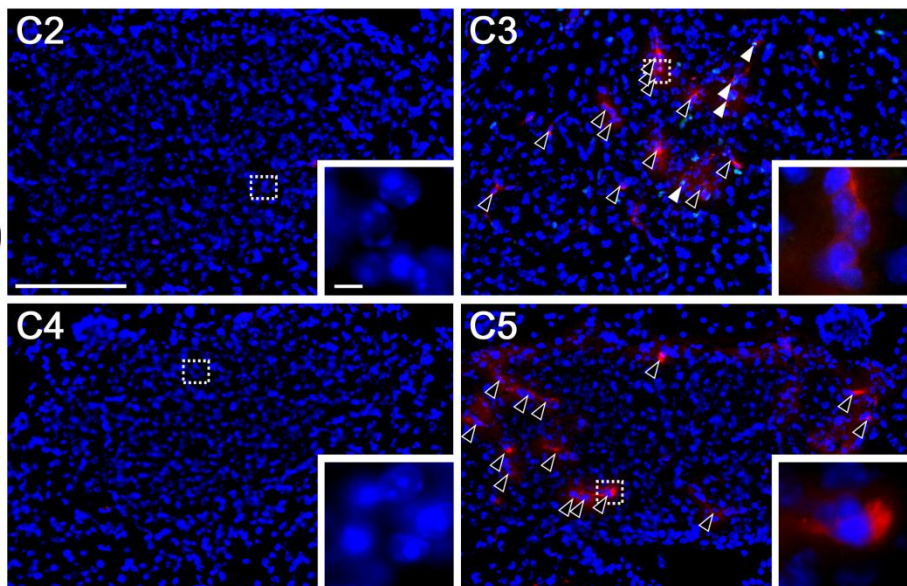
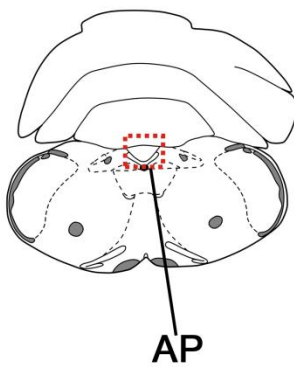
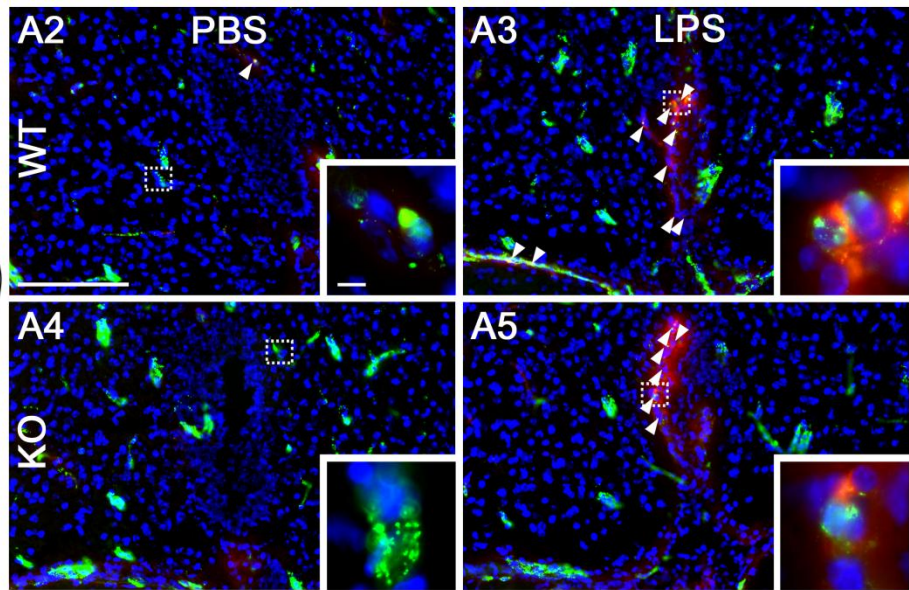
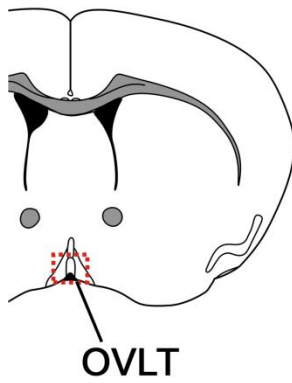


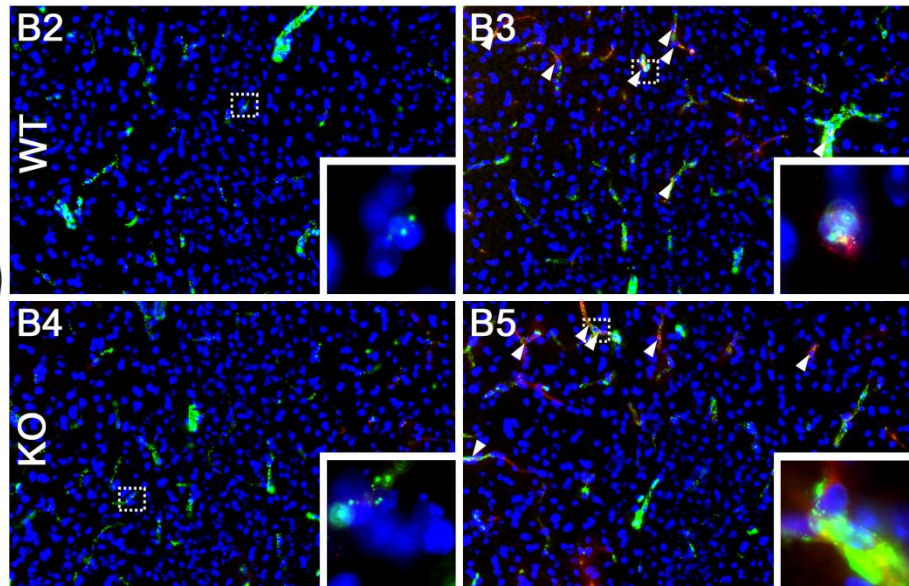
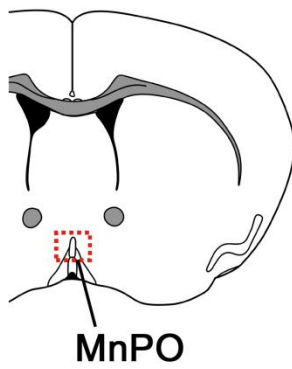
Abbildung III-23

Nachweis von neutrophilen Granulozyten (rot) und NF-IL6 (grün) in *nucleus arcuatus* (Arc) und *eminentia mediana* (ME, A), Hippocampus (B) und *area postrema* (AP, C) 24 h nach Stimulation mit „phosphate-buffered saline“ (PBS) oder 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS). Zellkerne sind in blau dargestellt. Alle untersuchten Regionen zeigten nach LPS-Stimulation vermehrt neutrophile Granulozyten in beiden Genotypen. Scale Bar in A2 = 100 µm, Scale Bar im Inset = 5 µm; Scale Bars in A2 sind repräsentativ für A2-A5, in B2 für B2-B5 und in C2 für C2-C5

A1 Übersicht



B1



C1

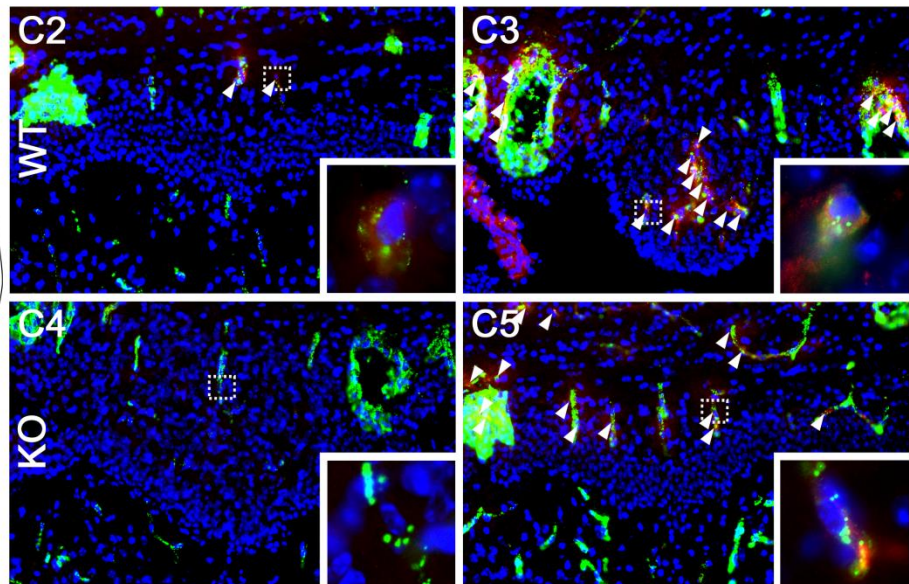
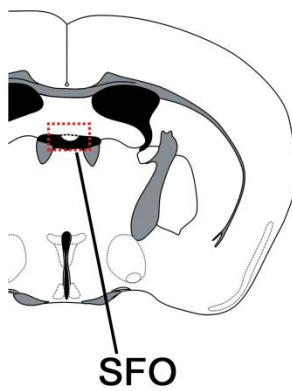


Abbildung III-24

Nachweis von neutrophilen Granulozyten (rot) und dem Gefäß-Marker von Willebrandt Faktor (grün) im *organum vasculosum lamina terminalis* (OVLT, A), *nucleus praeopticus medianus* (MnPO, B) und *organum subforicale* (SFO, C) 24 h nach Stimulation mit „phosphate-buffered saline“ (PBS) oder 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS). Zellkerne sind in blau dargestellt. In allen untersuchten Regionen wurden nach LPS-Stimulation in beiden Genotypen vermehrt neutrophile Granulozyten gefunden. Diese waren in der Regel Gefäß-assoziiert. Scale Bar in A2 = 100 µm, Scale Bar im Inset = 5 µm; Scale Bars in A2 sind repräsentativ für die gesamte

Abbildung

Die semiquantitative Auswertung dieser Ergebnisse ist in Abbildung III-25 und Abbildung III-26 dargestellt. In Abbildung III-22 und Abbildung III-23 wurde zusätzlich NF-IL6 detektiert. Die WT zeigten 24 h nach LPS-Stimulation vermehrt NF-IL6-Signale im Vergleich zu den Kontrollen. Die eingewanderten NG waren teils NF-IL6-positiv, teils NF-IL6-negativ. Die KO wiesen keine NF-IL6-Signale auf (semiquantitative Auswertung der NF-IL6-Signale siehe Kapitel III.2.3). In Abbildung III-24 wurde zusätzlich zu den NG der von Willebrand Faktor als Gefäß-Marker (grün) detektiert. Dabei wurde demonstriert, dass die in den verschiedenen Regionen detektierten NG Gefäß-assoziiert waren. Es konnte jedoch nicht bestimmt werden, ob die NG im Gefäß-Lumen an das Endothel angeheftet oder außerhalb des Gefäßes im Gewebe vorlagen.

Insgesamt war in den KO im Vergleich zu den WT 8 h nach LPS-Stimulation also eine verminderte Einwanderung von NG ins SFO zu beobachten. 24 h nach LPS-Stimulation war die Anzahl der NG in beiden Genotypen unverändert, lediglich die *fimbria hippocampi* wiesen in den KO vermehrt NG auf.

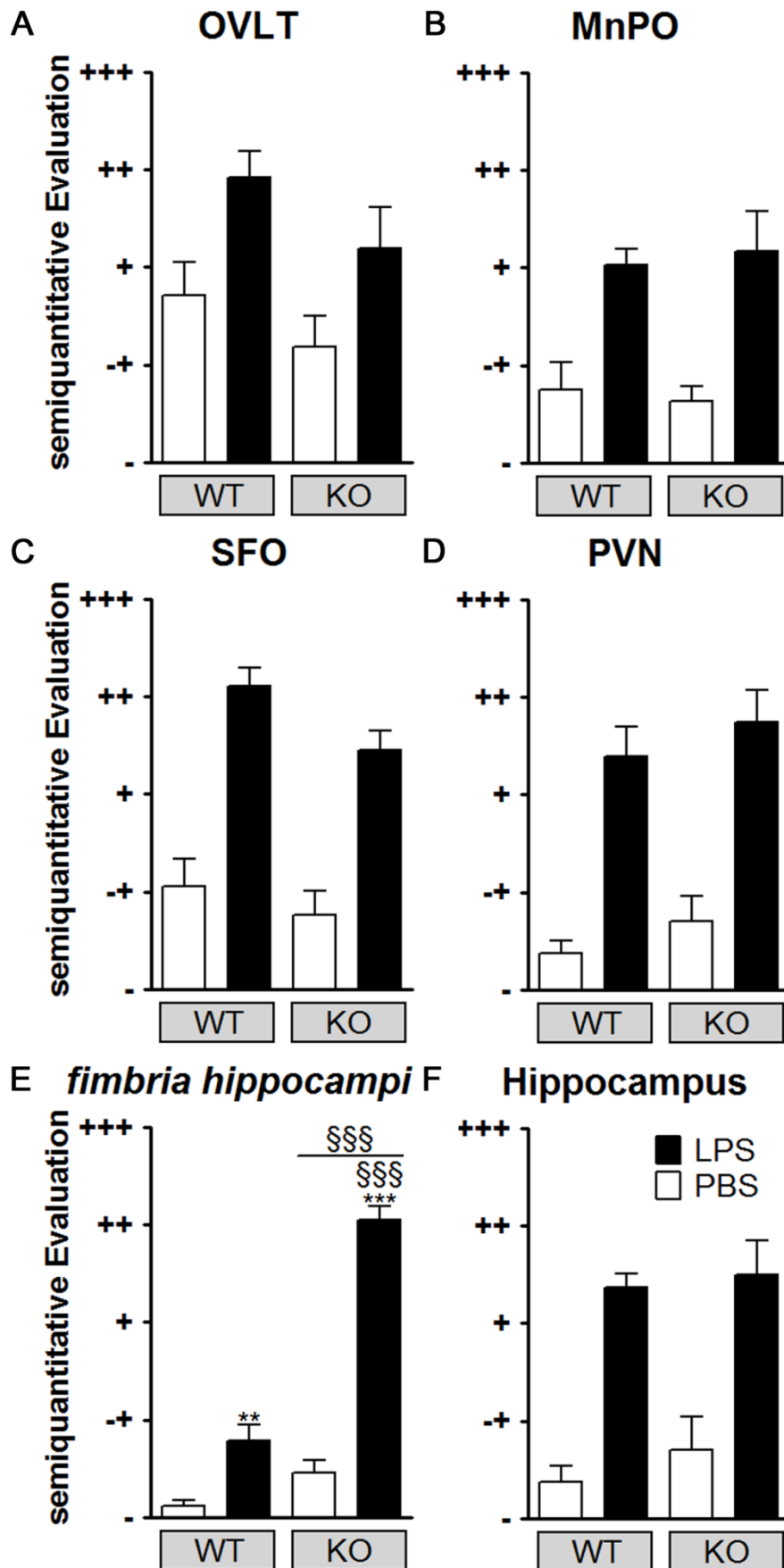


Abbildung III-25

Semiquantitative Evaluation der Anzahl der neutrophilen Granulozyten, die mittels Immunfluoreszenz in den Regionen *organum vasculosum lamina terminalis* (OVLT, A), *nucleus praeopticus medianus* (MnPO, B), *organum subfornicale* (SFO, C), *nucleus paraventricularis* (PVN, D), *fimbria hippocampi* (E) und Hippocampus (F) 24 h nach Stimulation mit „phosphate-buffered saline“ (PBS) oder 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS) detektiert wurde. Alle untersuchten Regionen zeigten einen LPS-induzierten Anstieg der neutrophilen Granulozyten in beiden Genotypen. Lediglich in den *fimbria hippocampi* zeigten die KO einen deutlich höheren Anstieg als die WT. § Haupteffekt Genotyp, § KO vs. WT, * LPS vs. PBS

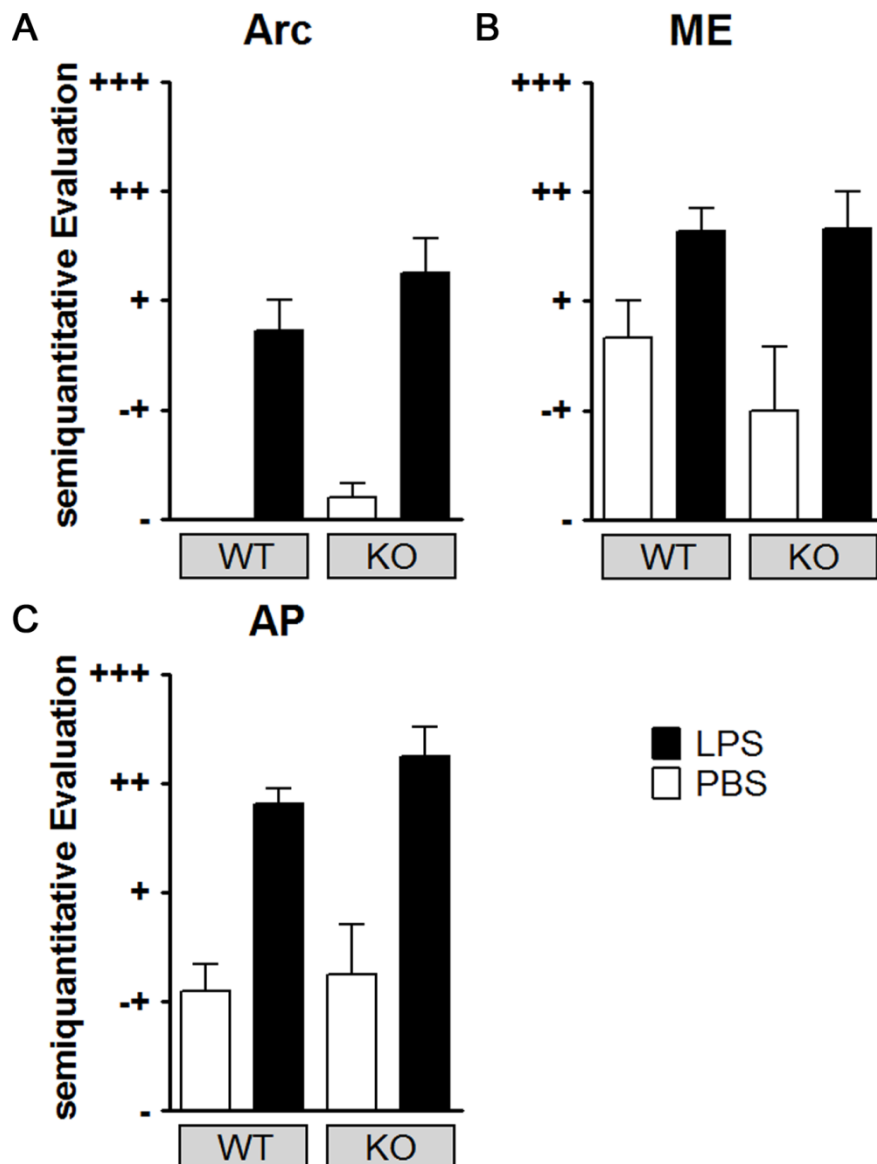


Abbildung III-26

Semiquantitative Evaluation der Anzahl der neutrophilen Granulozyten, die mittels Immunfluoreszenz in den Regionen *nucleus arcuatus* (Arc, A), *eminencia mediana* (ME, B) und *area postrema* (AP, C) 24 h nach Stimulation mit „phosphate-buffered saline“ (PBS) oder 2,5

mg/kg Lipopolysaccharid (LPS) detektiert wurde. Alle untersuchten Regionen zeigten einen LPS-induzierten Anstieg der neutrophilen Granulozyten in beiden Genotypen.

3.2 Beeinflussung der Kommunikation zwischen Peripherie und ZNS durch Neutropenie

Um die Rolle neutrophiler Granulozyten für die Kommunikation zwischen Immunsystem und Gehirn näher zu charakterisieren, wurde bei Mäusen eine Neutropenie induziert. Anschließend wurden die Tiere mit 2,5 mg/kg LPS stimuliert und 48 h später perfundiert. Die Kontrollgruppen erhielten PBS statt LPS und NRS statt des PMN-Antikörpers, mit dem die Neutropenie induziert wurde.

Neutropenie	Behandlung	Anzahl Tiere
Nein (NRS)	PBS	5
	LPS	5
Ja (PMN)	PBS	4
	LPS	4

Tabelle III-3

Anzahl der Tiere in den verschiedenen Behandlungsgruppen der „Neutropenie-Studie“. Jeweils 5 Tiere erhielten Kaninchenserum (NRS), also keine Induktion einer Neutropenie, und anschließend „phosphate-buffered saline“ (PBS) oder Lipopolysaccharid (LPS). Jeweils 4 Tiere erhielten den Antikörper gegen polymorphnukleäre Leukozyten (PMN), der eine Neutropenie induzierte, und anschließend LPS oder PBS.

Zunächst wurde die hypothalamische Expression verschiedener inflammatorischer Mediatoren untersucht (Abbildung III-27). Die Expression von IL-6 (B) und COX2 (E) wies keine Einflüsse durch Behandlung oder Neutropenie auf. IL-10 (C) war in den nicht-neutropenen Tieren LPS-induziert tendenziell erhöht exprimiert ($p = 0,09$), jedoch nicht in den neutropenen Tieren. Die Expression von NF-IL6 (A) war tendenziell in den neutropenen Tieren etwas vermindert (Haupteffekt „Neutropenie“ $p = 0,083$), während die Expression von CXCL1 (D) hingegen in den neutropenen Tieren signifikant vermindert war (Haupteffekt „Neutropenie“ $p = 0,0428$).

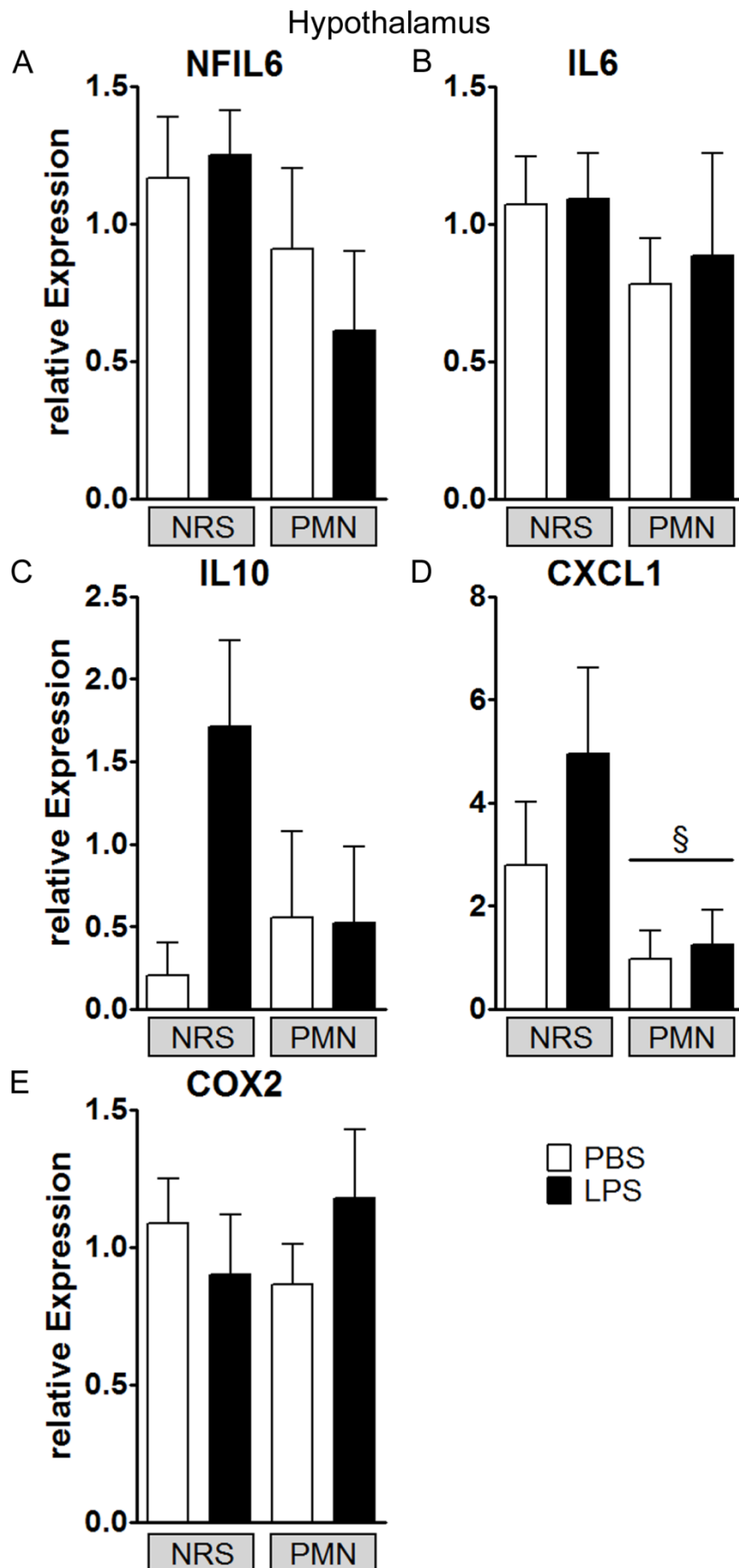


Abbildung III-27

Hypothalamische Expression von NF-IL6 (A), Interleukin (IL)-6 (B), IL-10 (C), dem Neutrophilen-spezifischen Chemokin CXCL1 (D) und der Cyclooxygenase 2 (COX2) (E) in neutropenen (PMN) und nicht-neutropenen (NRS) Tieren 48 h nach Behandlung mit „phosphate-buffered saline“ (PBS) oder 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS). Die neutropenen Tiere zeigten gegenüber den nicht-neutropenen Tieren eine verminderte Expression des CXCL1.

§ Haupteffekt „Neutropenie“

Im Cortex der Tiere (Abbildung III-28) zeigte die Expression von NF-IL6 (A), IL-6 (B), IL-10 (C) und CXCL1 (D) ebenfalls keine Veränderungen in Reaktion auf LPS gegenüber PBS. Lediglich die COX2-Expression (E) war nach LPS-Stimulation erhöht (Haupteffekt Behandlung $p = 0,0394$). Die Neutropenie hatte keinen Effekt auf die Expression von IL-10, CXCL1 und COX2. Die Expression von NF-IL6 sowie IL-6 war jedoch in den neutropenen Tieren erhöht (Haupteffekt „Neutropenie“, NF-IL6 $p = 0,0019$; IL-6 $p = 0,0376$).

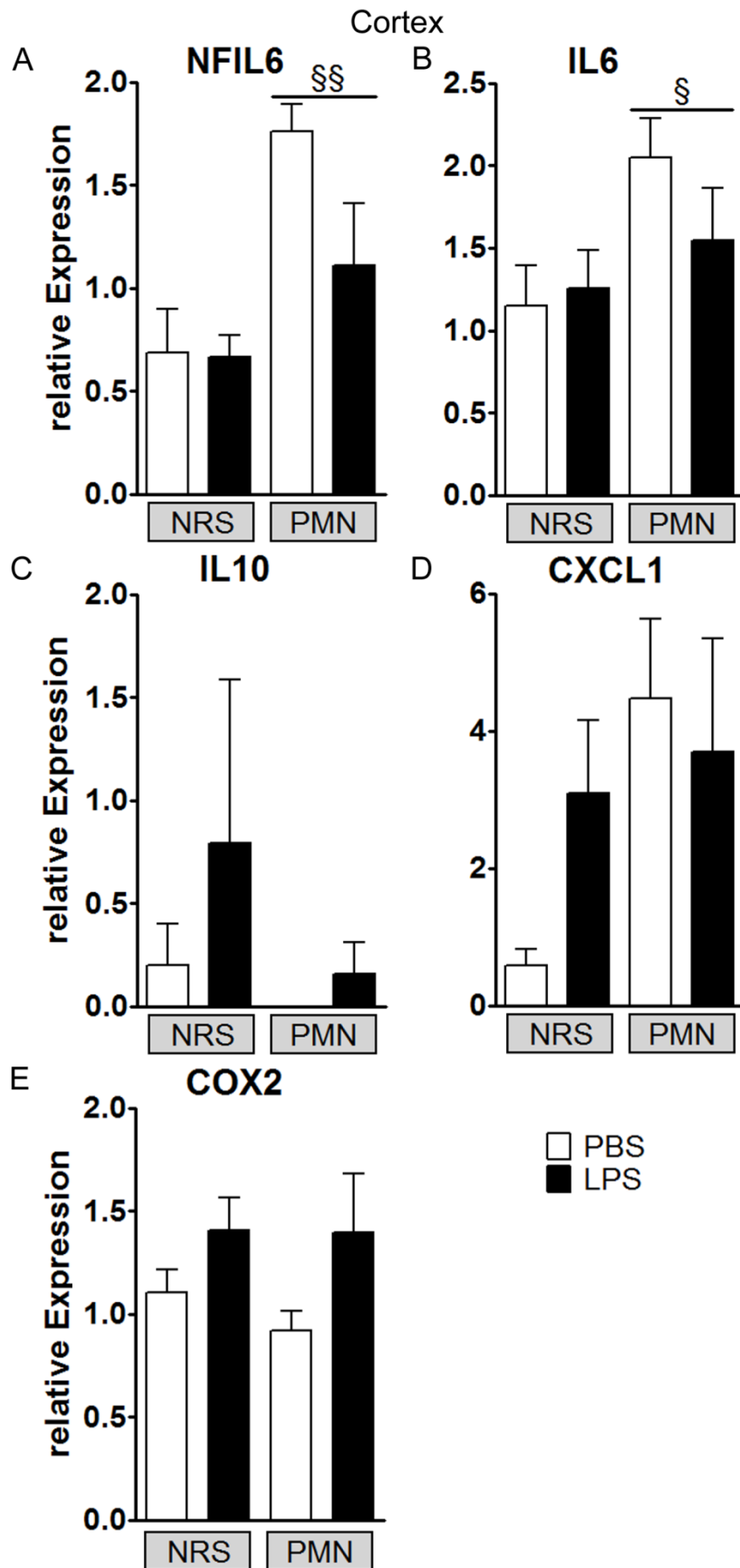


Abbildung III-28

Corticale Expression von NF-IL6 (A), Interleukin (IL)-6 (B), IL-10 (C), dem Neutrophilen-spezifischen Chemokin CXCL1 (D) und der Cyclooxygenase 2 (COX2) (E) in neutropenen (PMN) und nicht-neutropenen (NRS) Tieren 48 h nach Behandlung mit „phosphate-buffered saline“ (PBS) oder 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS). Die neutropenen Tiere zeigten gegenüber den nicht-neutropenen Tieren eine verstärkte Expression von NF-IL6 und IL-6. §
Haupteffekt „Neutropenie“

Zusätzlich wurden neutrophile Granulozyten sowie NF-IL6 mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen (Abbildung III-29 und Abbildung III-30). Abbildung III-31 stellt die semiquantitative Evaluation der detektierten neutrophilen Granulozyten im OVLT (A), SFO (B), PVN (C) und den *fimbria hippocampi* (D) dar. Die LPS-Behandlung induzierte einen signifikanten Anstieg der neutrophilen Granulozyten im OVLT, SFO und PVN der NRS-behandelten Tiere. Die Anzahl der neutrophilen Granulozyten in diesen Regionen war jedoch durch die Neutropenie signifikant reduziert, so dass - wenn überhaupt - nur vereinzelt neutrophile Granulozyten nachgewiesen werden konnten.

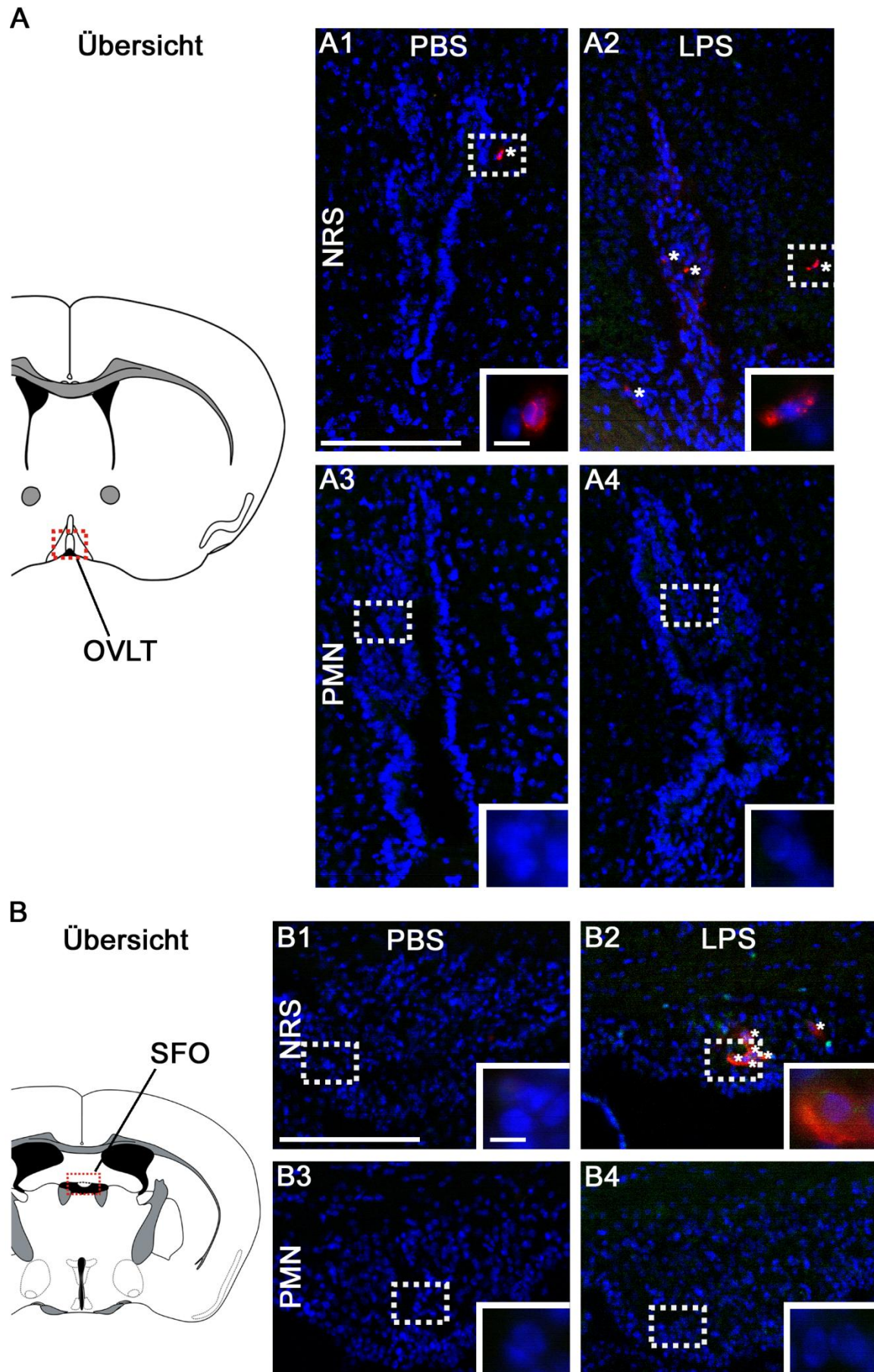


Abbildung III-29

Nachweis von neutrophilen Granulozyten (rot) und NF-IL6 (grün) mittels Immunfluoreszenz von Gewebeschnitten auf Höhe des *organum vasculosum lamina terminalis* (OVLt, A) sowie leicht caudal davon und des *organum subforficale* (SFO, B) in neutropenen (PMN) und nicht-neutropenen (NRS) Tieren 48 h nach Behandlung mit „phosphate-buffered saline“ (PBS) oder 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS). Zellkerne sind in blau dargestellt. Die LPS-behandelten, nicht neutropenen Tiere (A2, B2) zeigten gegenüber den PBS-behandelten Tieren (A1, B1) vermehrt neutrophile Granulozyten. Die neutropenen Tiere (A3-4, B3-4) zeigten nahezu keine neutrophile Granulozyten. Scale Bars in A1 und B1 = 100 µm; Scale Bars in den Insets = 5 µm; Scale Bars in A1 sind repräsentativ für A1-A4 und in B1 für B1-B4

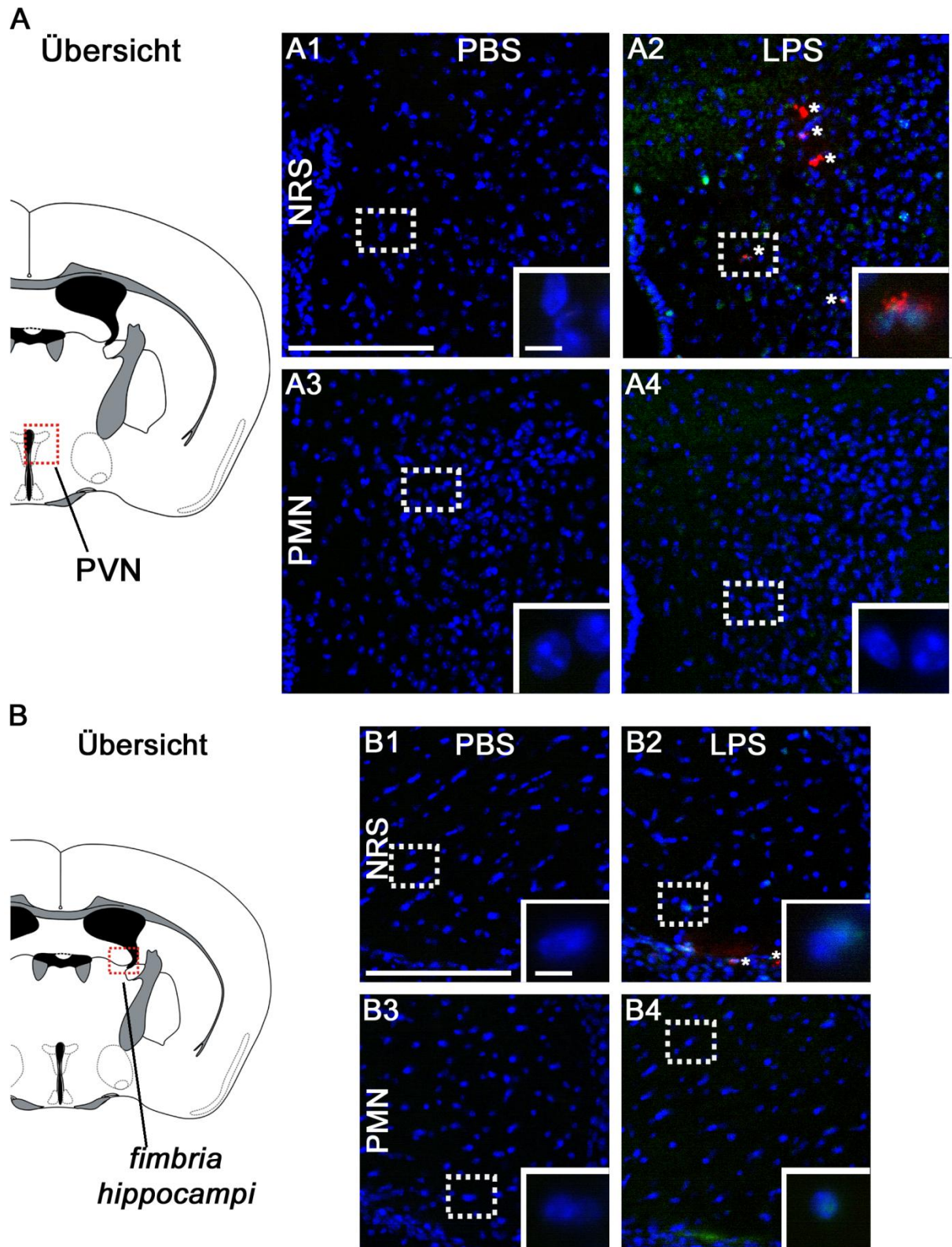


Abbildung III-30

Nachweis von neutrophilen Granulozyten (rot) und NF-IL6 (grün) mittels Immunfluoreszenz des *nucleus paraventricularis* (PVN, A) und der *fimbria hippocampi* (B) in neutropenen (PMN) und nicht-neutropenen (NRS) Tieren 48 h nach Behandlung mit „phosphate-buffered saline“

(PBS) oder 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS). Zellkerne sind in blau dargestellt. Die LPS-behandelten, nicht neutropenen Tiere (A2, B2) zeigten gegenüber den PBS-behandelten Tieren (A1, B1) vermehrt neutrophile Granulozyten. Die neutropenen Tiere (A3-4, B3-4) zeigten nahezu keine neutrophile Granulozyten. Scale Bars in A1 und B1 = 100 µm; Scale Bars in den Insets = 5 µm; Scale Bars in A1 sind repräsentativ für A1-A4 und in B1 für B1-B4

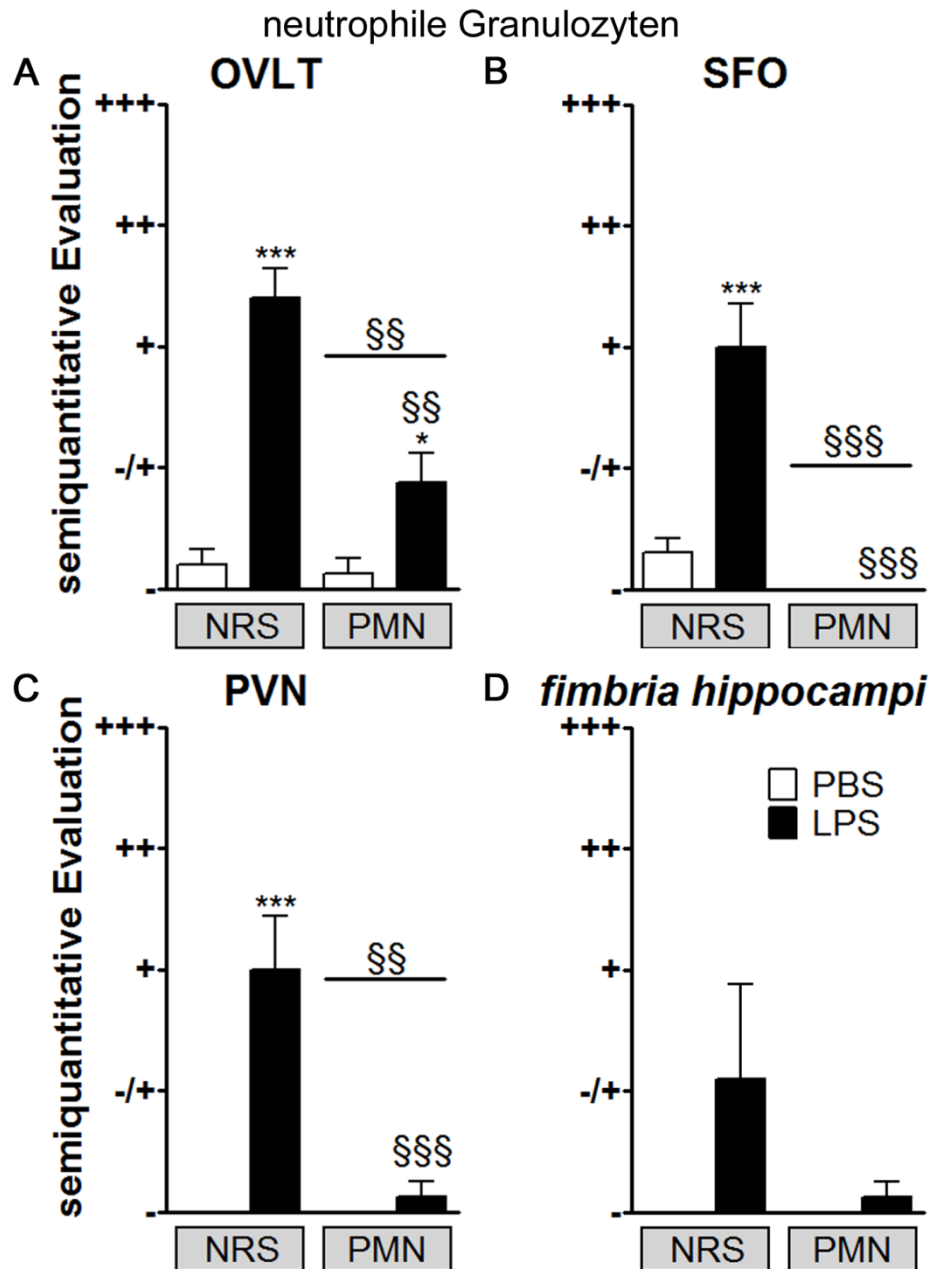


Abbildung III-31

Semiquantitative Evaluation der in der Immunfluoreszenz detektierten neutrophilen Granulozyten in neutropenen (PMN) und nicht-neutropenen (NRS) Tieren im *organum vasculosum lamina terminalis* (OVLT, A), *organum subforficale* (SFO, B), *nucleus paraventricularis* (PVN, C) und den *fimbria hippocampi* (D) 48 h nach Stimulation mit

„phosphate-buffered saline“ (PBS) oder 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS). Die nicht-neutropenen Tiere zeigten einen LPS-induzierten Anstieg der neutrophilen Granulozyten im OVLT, SFO und PVN, während in den neutropenen Tieren fast keine neutrophilen Granulozyten nachweisbar waren. § Haupteffekt „Neutropenie“, § PMN vs. NRS, * LPS vs. PBS

In Abbildung III-32 ist die semiquantitative Evaluation der in der Immunfluoreszenz detektierten NF-IL6-Signale dargestellt. Alle Tiere zeigten in allen untersuchten Regionen einen Anstieg der NF-IL6-Signale nach LPS-Behandlung (Haupteffekt Behandlung, OVLT $p = 0,0001$; SFO $p < 0,0001$; PVN $p < 0,0001$; *fimbria hippocampi* $p = 0,0215$). Die neutropenen Tiere wiesen jedoch im SFO eine Verminderung der NF-IL6-Signale gegenüber den NRS-behandelten Tieren auf (Haupteffekt „Neutropenie“ $p = 0,0013$). Auch im PVN der neutropenen Tiere waren die NF-IL6-Signale tendenziell vermindert im Vergleich zu den NRS-behandelten Tieren (Haupteffekt „Neutropenie“ $p = 0,0528$).

Zusammenfassend zeigten die neutropenen Tiere also im Vergleich zu den NRS-behandelten Kontrollen verminderte hypothalamische CXCL1- und tendenziell verminderte IL-10-Expression sowie verminderte NF-IL6-Immunreaktivität im SFO und tendenziell im PVN sowie erhöhte NF-IL6- und IL-6-Expression im Cortex.

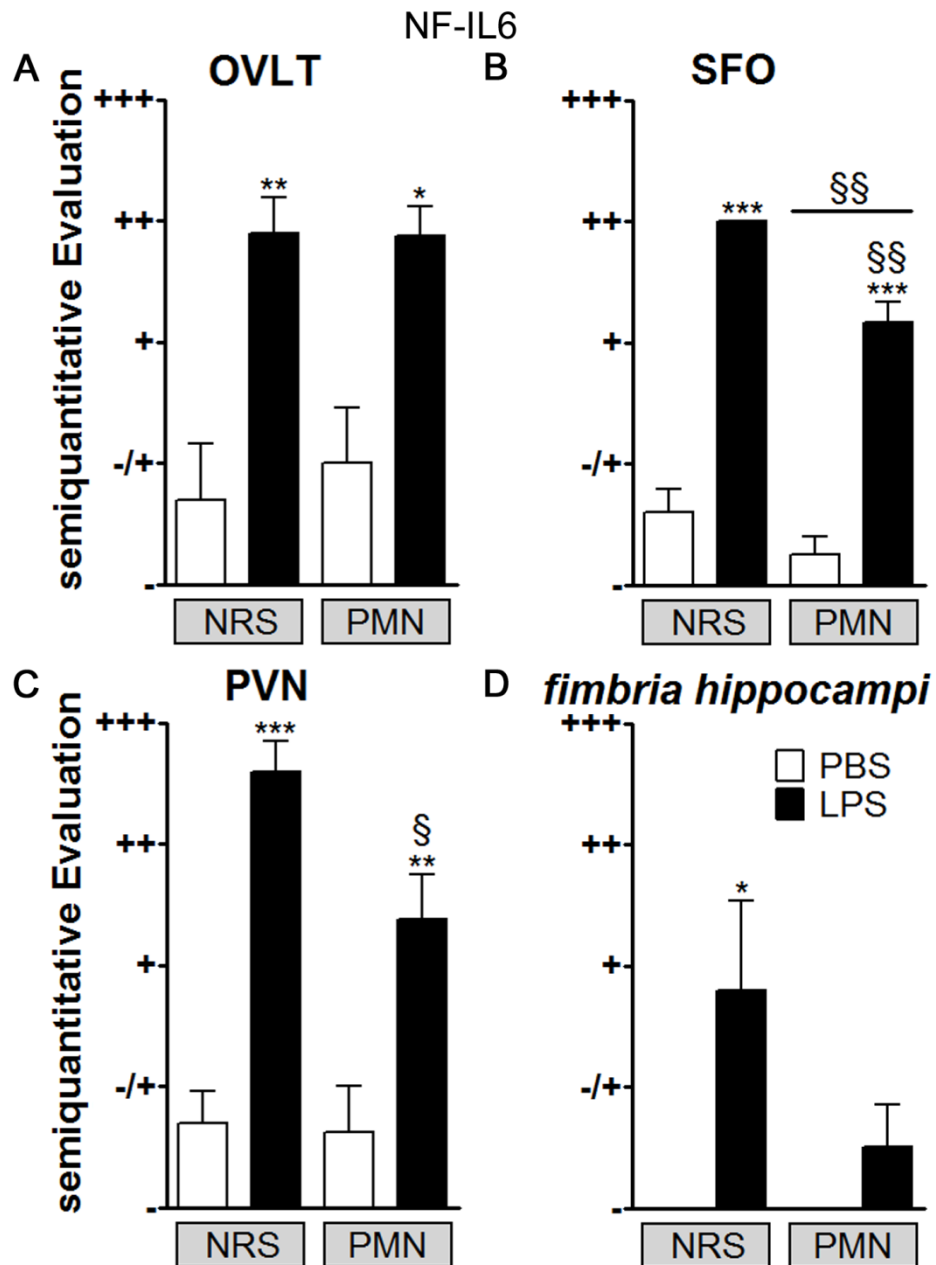


Abbildung III-32

Semiquantitative Evaluation der in der Immunfluoreszenz detektierten NF-IL6-Signale in neutropenen (PMN) und nicht-neutropenen (NRS) Tieren im *organum vasculosum lamina terminalis* (OVLT, A), *organum subfornicale* (SFO, B), *nucleus paraventricularis* (PVN, C) und den *fimbria hippocampi* (D) 48 h nach Stimulation mit „phosphate-buffered saline“ (PBS) oder 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS). Alle Tiere zeigten eine LPS-induzierte Zunahme der NF-IL6-Signale. Die neutropenen Tiere zeigten jedoch im SFO und tendenziell auch im PVN gegenüber den nicht-neutropenen Tieren verminderte NF-IL6-Signale. § Haupteffekt „Neutropenie“, § PMN vs. NRS, * LPS vs. PBS

3.3 Perivaskuläre Makrophagen

Da die hypothalamische Expression des Zellmarkers für perivaskuläre Makrophagen, CD163, 24 h nach LPS-Stimulation in den WT erhöht war, nicht jedoch in den KO, wurde eine Immunfluoreszenz des SFO zum Nachweis von perivaskulären Makrophagen 24 h nach der Behandlung durchgeführt (Abbildung III-33).

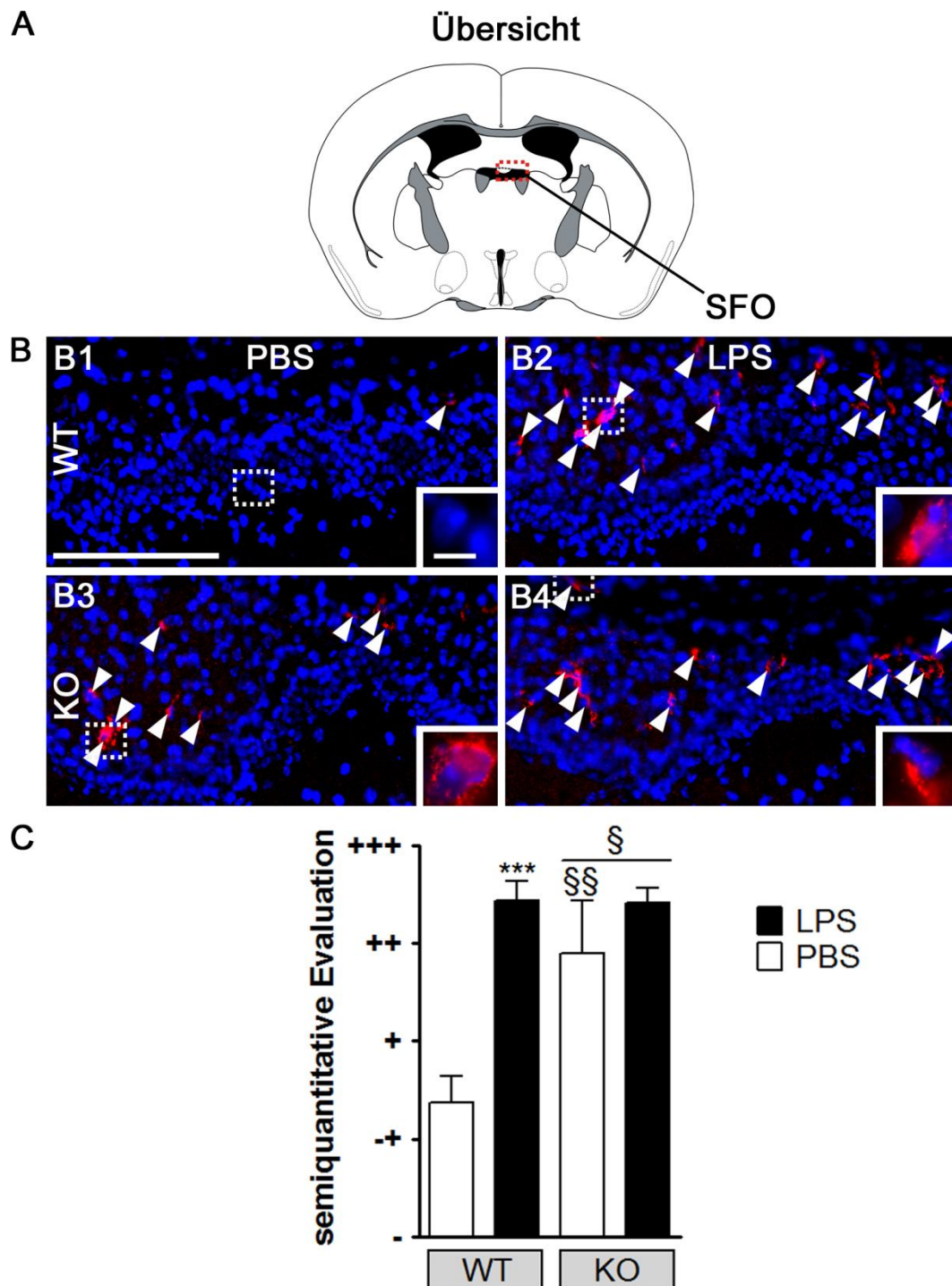


Abbildung III-33

Nachweis von perivaskulären Makrophagen (rot) im *organum subfornicale* (SFO, A) mittels Immunfluoreszenz 24 h nach Behandlung mit „phosphate-buffered saline“ (PBS) oder 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS). Zellkerne sind in blau dargestellt. WT zeigten nach PBS-Behandlung (B1) kaum perivaskuläre Makrophagen, während LPS einen starken Anstieg der Makrophagen in den WT induzierte (B2). Die KO hingegen zeigten bereits nach PBS-Behandlung (B3) im Vergleich zu den WT vermehrte perivaskuläre Makrophagen, deren Anzahl durch LPS-Behandlung (B4) nicht weiter erhöht wurde. (C) zeigt die semiquantitative Evaluation der detektierten perivaskulären Makrophagen. § Haupteffekt Genotyp, § KO vs. WT, * LPS vs. PBS, Scale Bar in B1 = 100 µm; Scale Bar im Inset = 5 µm; Scale Bars sind repräsentativ für B1-B4

Die WT zeigten 24 h nach LPS-Stimulation (B2) gegenüber den PBS-behandelten WT (B1) vermehrt perivaskuläre Makrophagen im SFO. Die KO hingegen wiesen nach PBS-Behandlung (B3) bereits signifikant vermehrte perivaskuläre Makrophagen im Vergleich zu den PBS-behandelten WT auf (*post-hoc* $p < 0,01$). LPS-Stimulation induzierte in den KO (B4) keinen weiteren Anstieg der perivaskulären Makrophagen.

4. Beeinflussung der Entzündungsreaktion durch das LIP:LAP-Verhältnis

Die meisten untersuchten inflammatorischen Mediatoren waren in den WT 8 h nach LPS-Stimulation deutlich erhöht, während die Mediatoren 24 h nach LPS-Behandlung meist nur noch geringgradig gegenüber den Kontrollen erhöht waren. Die KO hingegen zeigten 8 h nach LPS-Stimulation einen deutlich geringeren Anstieg der meisten inflammatorischen Mediatoren im Vergleich zu den WT. 24 h nach LPS-Stimulation hingegen waren diese Mediatoren in den KO gegenüber den WT erhöht. Zusätzlich wurde eine vorübergehende verminderte Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten ins SFO 8 h nach LPS-Stimulation in den KO beobachtet. Im Vergleich zu den WT wiesen die KO 8 h nach LPS-Stimulation also eher eine verminderte, 24 h nach LPS-Stimulation jedoch eine verstärkte Inflammation auf. NF-IL6 scheint 8 h nach Beginn der Inflammation also eher pro-, 24 h nach Beginn der Entzündung jedoch eher anti-inflammatorisch zu wirken. Als eine mögliche Ursache für diesen Effekt wurde eine Veränderung der Menge der verschiedenen Isoformen von NF-IL6 vermutet. Die aktivierende Isoform LAP könnte die frühe, pro-inflammatorische

Wirkung von NF-IL6 vermitteln, während die spätere, anti-inflammatorische Wirkung durch die inhibitorische Isoform LIP kontrolliert sein könnte. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde NF-IL6 im Hypothalamus der WT mittels Western Blot nachgewiesen (Abbildung III-34). Dabei wurde β -Actin zur Normalisierung verwendet (Bande bei 42,31 kDa). Außerdem wurde bei 34,89 kDa eine weitere Bande detektiert, die als LAP identifiziert wurde (C). LIP (20 kDa) konnte nicht im Western Blot nachgewiesen werden. Die Quantifizierung der Bandengröße ergab 8 h nach LPS-Stimulation (A) erhöhte LAP-Proteinmengen im Vergleich zu den PBS-behandelten WT (*student's t-Test* $p = 0,0027$). 24 h nach der Behandlung (B) war kein Unterschied zwischen PBS- und LPS-Behandlung feststellbar.

Dieses Ergebnis zeigte also einen Anstieg von LAP 8 h nach LPS-Behandlung, wodurch der erste Teil der Hypothese unterstützt wurde. Da jedoch kein LIP nachgewiesen werden konnte, konnte die gesamte Hypothese weder eindeutig nachgewiesen noch widerlegt werden.

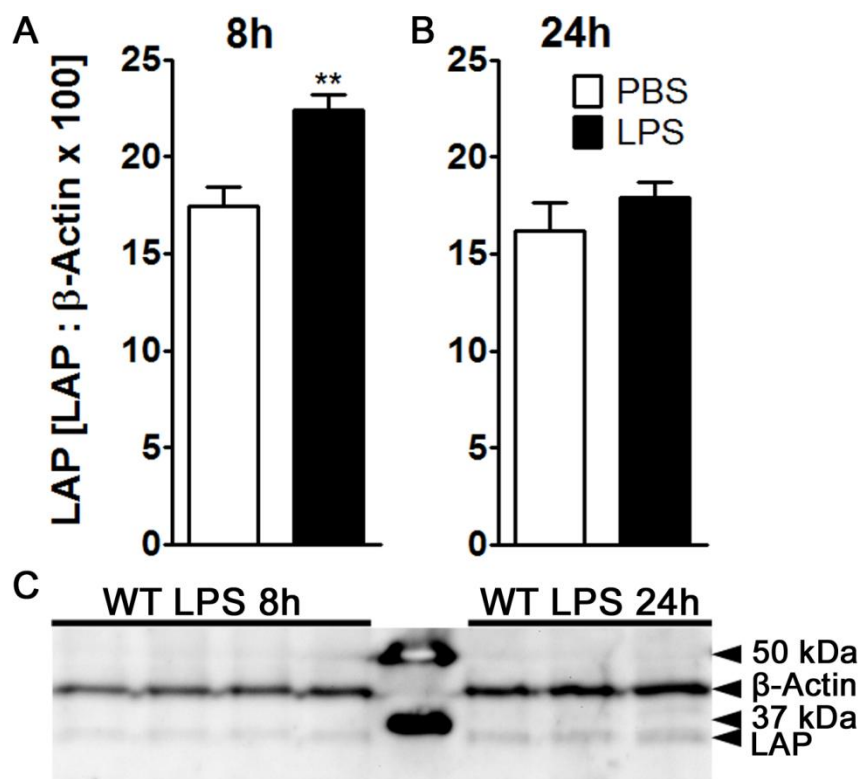


Abbildung III-34

Nachweis von NF-IL6 mittels Western Blot im Hypothalamus der WT 8 und 24 h nach Behandlung mit „phosphate-buffered saline“ (PBS) oder 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS).

(A) 8 h nach LPS-Behandlung zeigten die WT vermehrt LAP im Vergleich zu den PBS-behandelten Kontrollen. (B) 24 h nach der Behandlung war kein Unterschied zwischen PBS- und LPS-behandelten Tieren feststellbar. (C) β -Actin (Bande bei 42,31 kDa) wurde zur Normalisierung eingesetzt, LAP wurde bei 34,89 kDa detektiert. LIP konnte nicht im Western Blot nachgewiesen werden. * LPS vs. PBS

5. Veränderungen der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse in NF-IL6-Knockout-Mäusen

2 bis 4 h nach dem NES zeigten die KO erhöhte lokomotorische Aktivität im Vergleich zu den WT. Dies war ein erster Hinweis darauf, dass die HPA-Achse und die Stress-Antwort in den KO beeinträchtigt sein könnten. Zudem wurde früher bereits eine Beteiligung von NF-IL6 an der Regulation der HPA-Achse vermutet (Fuchs et al. 2013). Da die HPA-Achse zudem auch eine wichtige Rolle in der Regulation der „sickness response“ spielt, wurde sie hier näher untersucht.

Dazu wurde zunächst Corticosteron im Blutplasma der Mäuse gemessen (Abbildung III-35 A, Abbildung III-36 A). Da die Tiere immer morgens zur gleichen Zeit mit PBS oder LPS behandelt wurden, war der Zeitpunkt 8 h nach der Behandlung also abends, während 24 h nach der Behandlung wiederum morgens war. Die Corticosteron-Plasmaspiegel der WT zeigten basal einen normalen zirkadianen Rhythmus mit niedrigen Spiegeln morgens (24 h) und hohen Corticosteron-Spiegeln abends (8 h) zum Beginn der Aktivitätsphase der Mäuse. Nach LPS-Stimulation hatten die WT 8 und 24 h nach der Behandlung erhöhte Corticosteron-Spiegel. Die KO hingegen wiesen keine basale zirkadiane Rhythmik der Corticosteron-Level auf. Während abends (8 h) ebenso wie für WT hohe Corticosteron-Level nachgewiesen wurden, waren diese morgens (24 h) ähnlich hoch wie bereits nach 8 h und damit signifikant höher als die der WT (*post-hoc* $p < 0,001$). Auch die KO zeigten 8 h nach LPS-Behandlung erhöhte Corticosteron-Werte nicht jedoch nach 24 h.

Des Weiteren wurde die POMC-Expression in der Hypophyse bestimmt (B). Hier wiesen die KO ebenfalls basal erhöhte Expression im Vergleich zu den WT auf (*post-*

hoc $p < 0,05$), während die LPS-Behandlung weder nach 8 noch nach 24 h eine Veränderung der Expression bewirkte.

Zusätzlich wurde eine exemplarische Immunfluoreszenz für POMC an je einer Hypophyse von einem PBS- (Abbildung III-36 Ea) und einem LPS-behandelten WT (Eb) sowie einem LPS-behandelten KO (Ec) durchgeführt. Dabei wurden im Vorderlappen (AL) der WT-Hypophyse nach LPS-Stimulation vermehrt POMC-Signale im Vergleich zur PBS-Behandlung und im Vergleich zum LPS-behandelten KO gefunden. Der Zwischenlappen (InL) zeigte in den WT starke POMC-Signale, während der Zwischenlappen des LPS-behandelten KO weniger POMC aufwies. Im Hinterlappen (PL) wurden keine POMC-Signale gefunden.

Als wichtiger Regulator der HPA-Achse wurde zusätzlich auch die hypothalamische Expression des PACAP (C) sowie seines Rezeptors VIPR1 (D) bestimmt. PACAP ist außerdem dafür bekannt, dass es an der Regulation der „inneren Uhr“ im SCN beteiligt ist. Knockout-Mäuse, denen ein anderer PACAP-Rezeptor – VPAC2 – fehlt, zeigen verminderte zirkadiane Rhythmik sowie verminderte nächtliche Aktivität (Hannibal et al. 2011). Da die zirkadiane Rhythmik jedoch nur vermindert, jedoch nicht vollständig verhindert war, wurde vermutet, dass VPAC2 und VIPR1 gleichermaßen an der Regulation der „inneren Uhr“ sowie der Aktivität beteiligt sind (Joo et al. 2004). Da die Expression des VIPR1, nicht jedoch des VPAC2, durch NF-IL6 reguliert wird (Sreedharan et al. 1995), wurde in dieser Studie nur VIPR1 untersucht. PACAP zeigte keine Veränderung der Expression in Abhängigkeit von Behandlung oder Genotyp. Der VIPR1 hingegen war in den KO basal vermindert exprimiert (*post-hoc* $p < 0,05$).

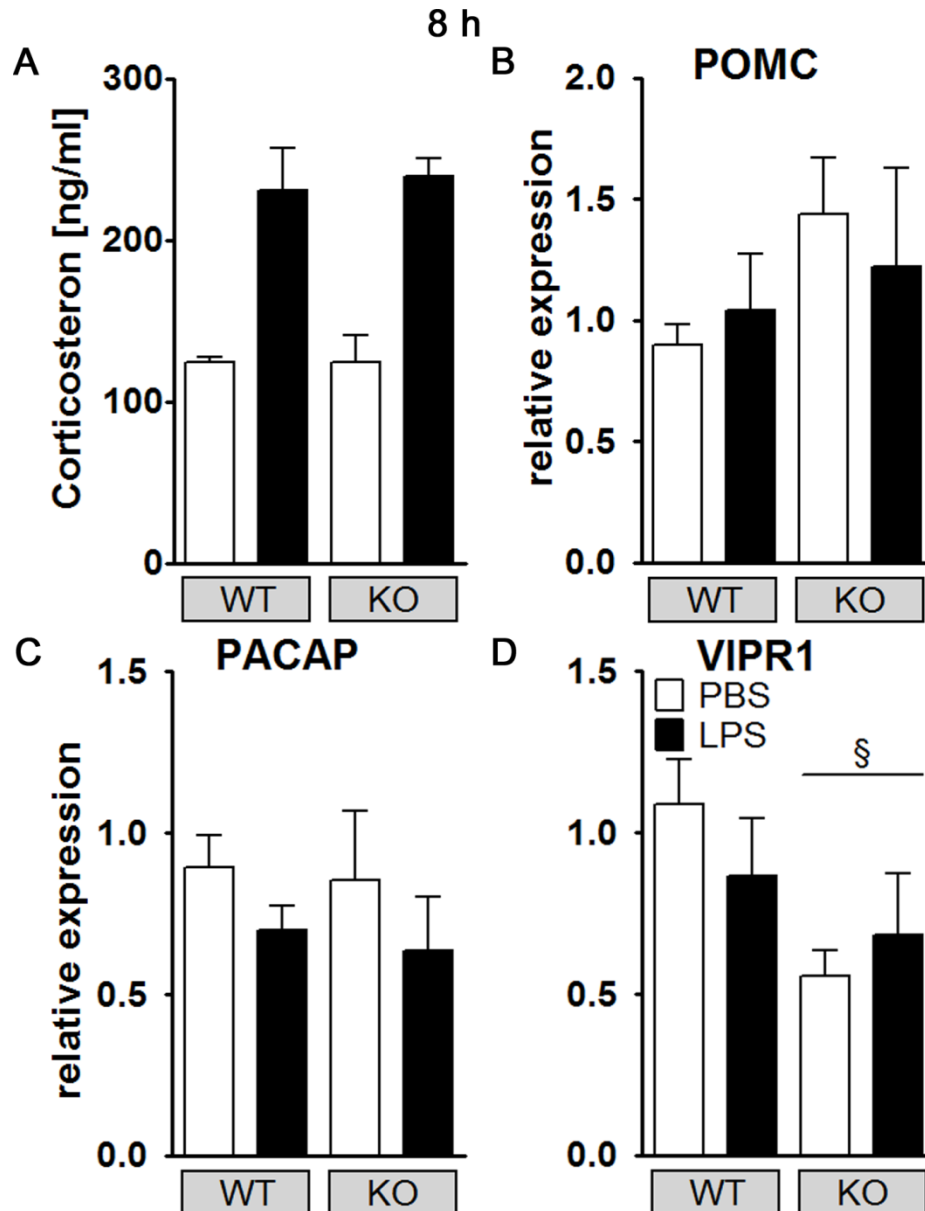


Abbildung III-35

Corticosteron-Plasmaspiegel (A), Expression des Proopiomelanocortins (POMC) in der Hypophyse (B) sowie hypothalamische Expression des „pituitary adenylate cyclase-activating peptide“ (PACAP, C) und seines Rezeptors VIPR1 (D) 8 h nach Stimulation mit „phosphate-buffered saline“ (PBS) oder 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS). Die KO zeigten gegenüber den WT verminderte Expression des VIPR1. § Haupteffekt Genotyp

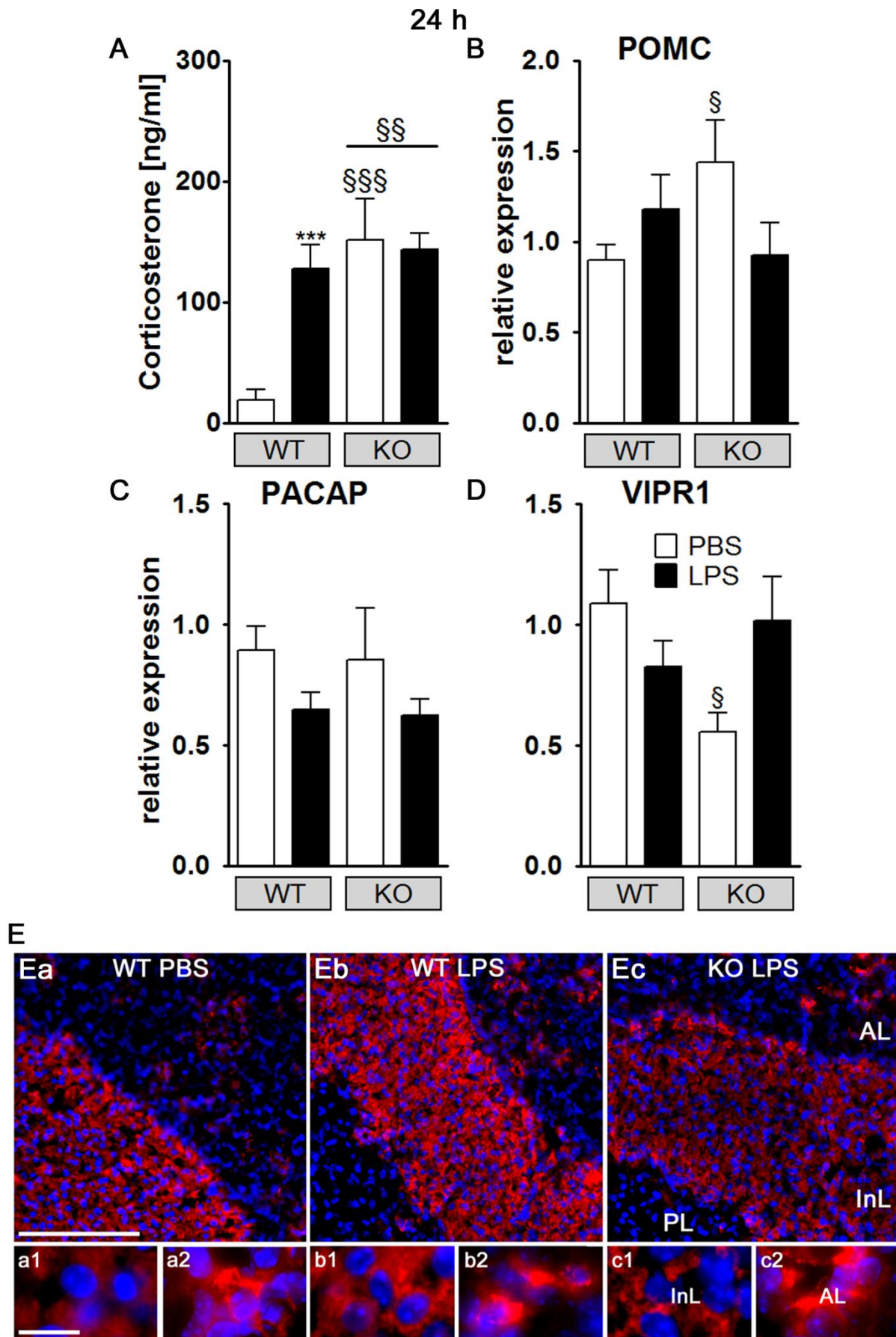


Abbildung III-36

Corticosteron-Plasmaspiegel (A), Expression des Proopiomelanocortins (POMC) in der Hypophyse (B), hypothalamische Expression des „pituitary adenylate cyclase-activating peptide“ (PACAP, C) und seines Rezeptors VIPR1 (D) sowie Nachweis von POMC (rot) mittels Immunfluoreszenz der Hypophyse 24 h nach Stimulation mit „phosphate-buffered saline“ (PBS) oder 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS). Die KO zeigten im Vergleich zu den WT erhöhte basale Corticosteron-Level sowie erhöhte POMC-Expression in der Hypophyse, während die Expression des VIPR1 basal vermindert war. Im Hypophysen-Vorderlappen (AL) zeigten die WT nach LPS-Behandlung vermehrt POMC im Vergleich zum PBS-behandelten WT und zum LPS-behandelten KO. Im Zwischenlappen (InL) zeigten die KO gegenüber den WT verminderte POMC-Signale, unabhängig von der Behandlung. Im Hinterlappen (PL) waren keine POMC-Signale detektierbar. a-c1 zeigen 100-fache Vergrößerungen des InL, a-c2 des AL. Zellkerne sind blau dargestellt. Scale Bar in Ea = 100 μ m – repräsentativ für Ea-Ec; Scale Bar in a1 = 10 μ m – repräsentativ für a1-c2. § Haupteffekt Genotyp, § KO vs. WT, * LPS vs. PBS

Um diese Verminderung des VIPR1 zu bestätigen, wurde eine Immunhistochemie verschiedener Gehirnregionen durchgeführt. 8 h nach der Behandlung (Abbildung III-37) konnten dabei keine Einflüsse der Behandlung oder des Genotyps auf das Vorkommen des VIPR1 im SFO (A), PVN (B), Cortex (C) oder SCN (D) festgestellt werden. 24 h nach der Behandlung (Abbildung III-38) zeigten SFO (A) und PVN (B) ebenfalls keine Veränderungen des VIPR1, während im Cortex (C und Abbildung III-39) basal und im SCN (D) sowohl nach PBS- als auch nach LPS-Behandlung im Vergleich zu den WT weniger VIPR1 nachgewiesen wurde (Cortex: *post-hoc* $p < 0,001$; SCN: Haupteffekt Genotyp $p = 0,0401$).

Zusammenfassend zeigten die KO also basal einige Veränderungen der HPA-Achse im Vergleich zu den WT. Diese Veränderungen umfassten vermehrte POMC-Expression in der Hypophyse, verminderte Expression des VIPR1 im Hypothalamus sowie eine fehlende zirkadiane Rhythmik der Corticosteron-Plasmaspiegel.

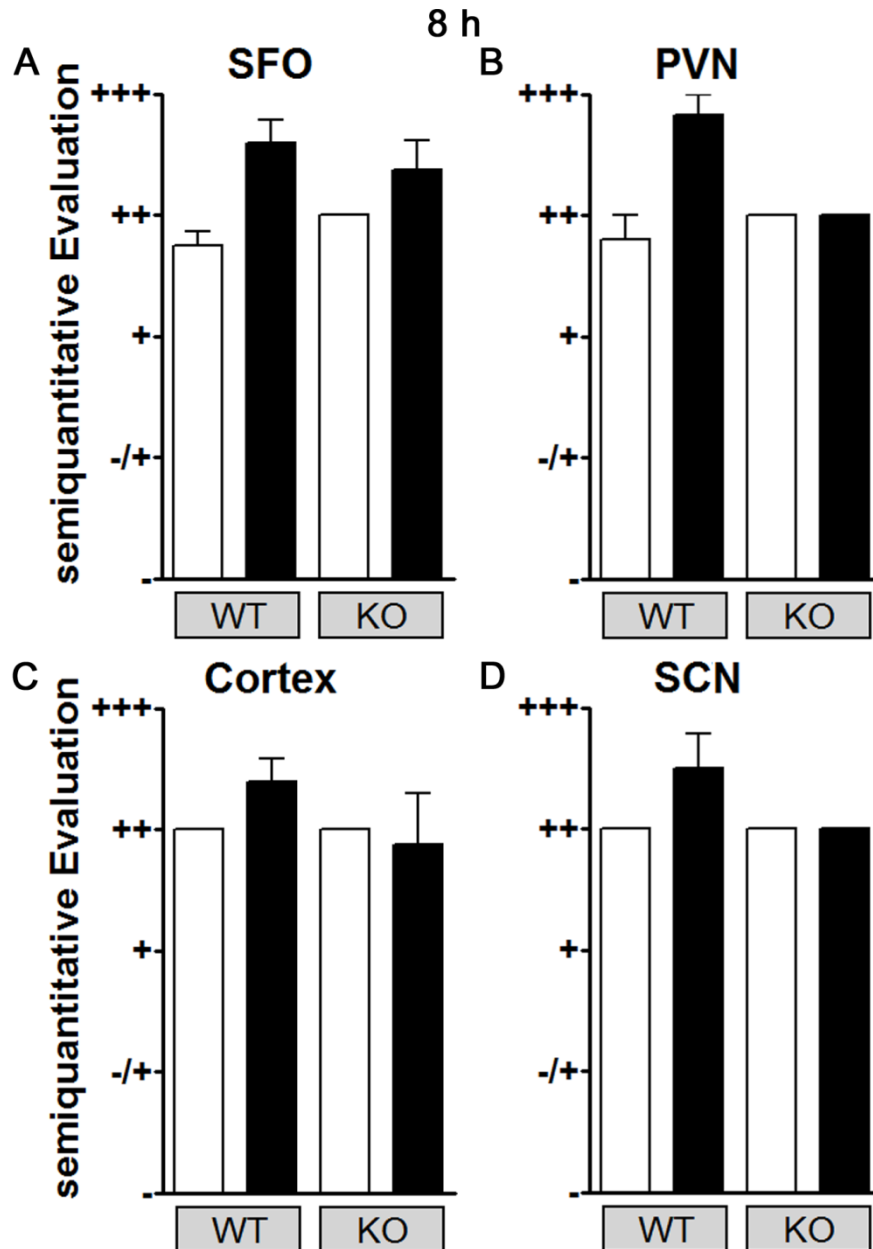


Abbildung III-37

Semiquantitative Auswertung des immunhistochemischen Nachweises von VIPR1 im *organum subfornicale* (SFO, A), *nucleus paraventricularis* (PVN, B), Cortex (C) und *nucleus suprachiasmaticus* (SCN, D) 8 h nach Behandlung mit „phosphate-buffered saline“ (PBS) oder 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS). Es waren keine Unterschiede zwischen den Genotypen detektierbar.

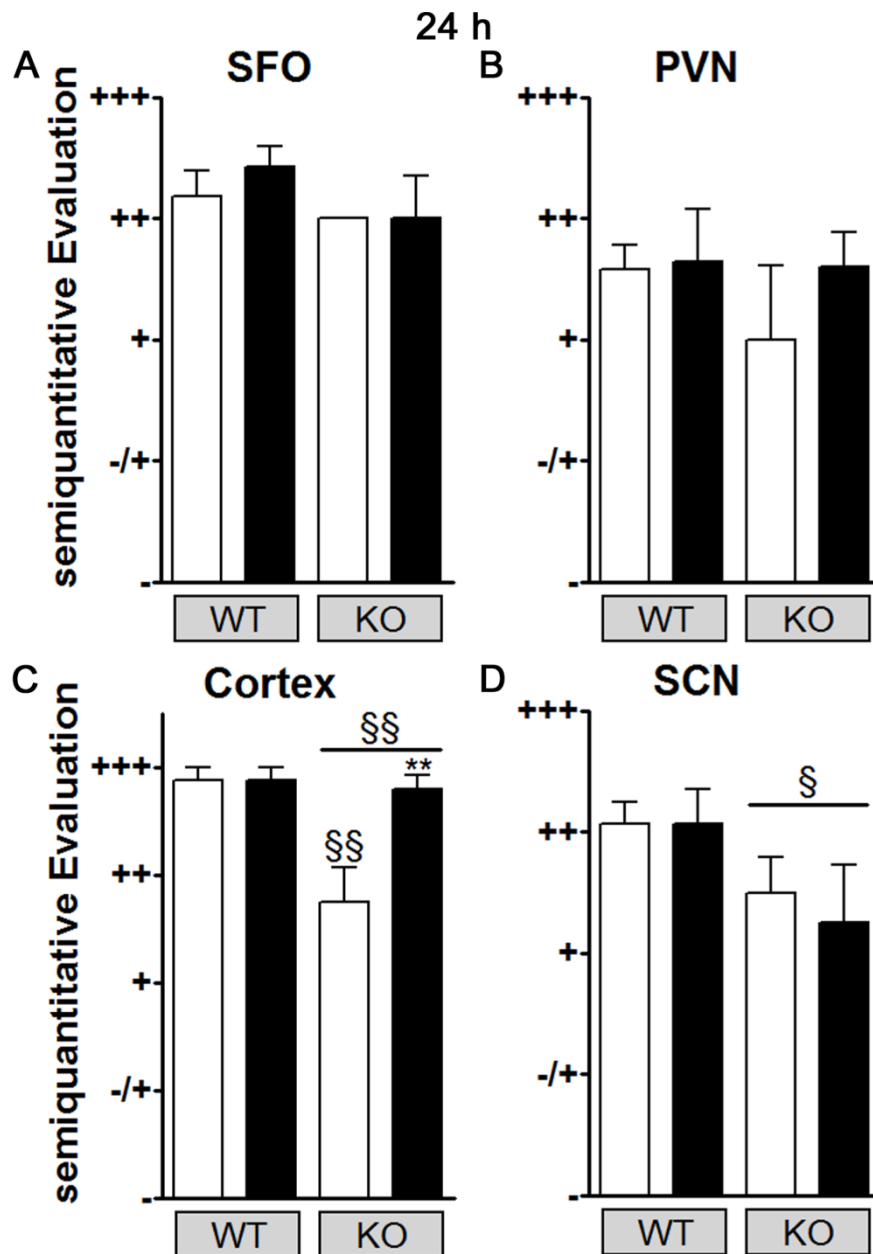


Abbildung III-38

Semiquantitative Auswertung des immunhistochemischen Nachweises von VIPR1 im *organum subfornicale* (SFO, A), *nucleus paraventricularis* (PVN, B), Cortex (C) und *nucleus suprachiasmaticus* (SCN, D) 24 h nach Behandlung mit „phosphate-buffered saline“ (PBS) oder 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS). Die KO zeigten verminderte VIPR1-Signale basal im Cortex und unabhängig von der Behandlung im SCN. § Haupteffekt Genotyp, § KO vs. WT, * LPS vs. PBS

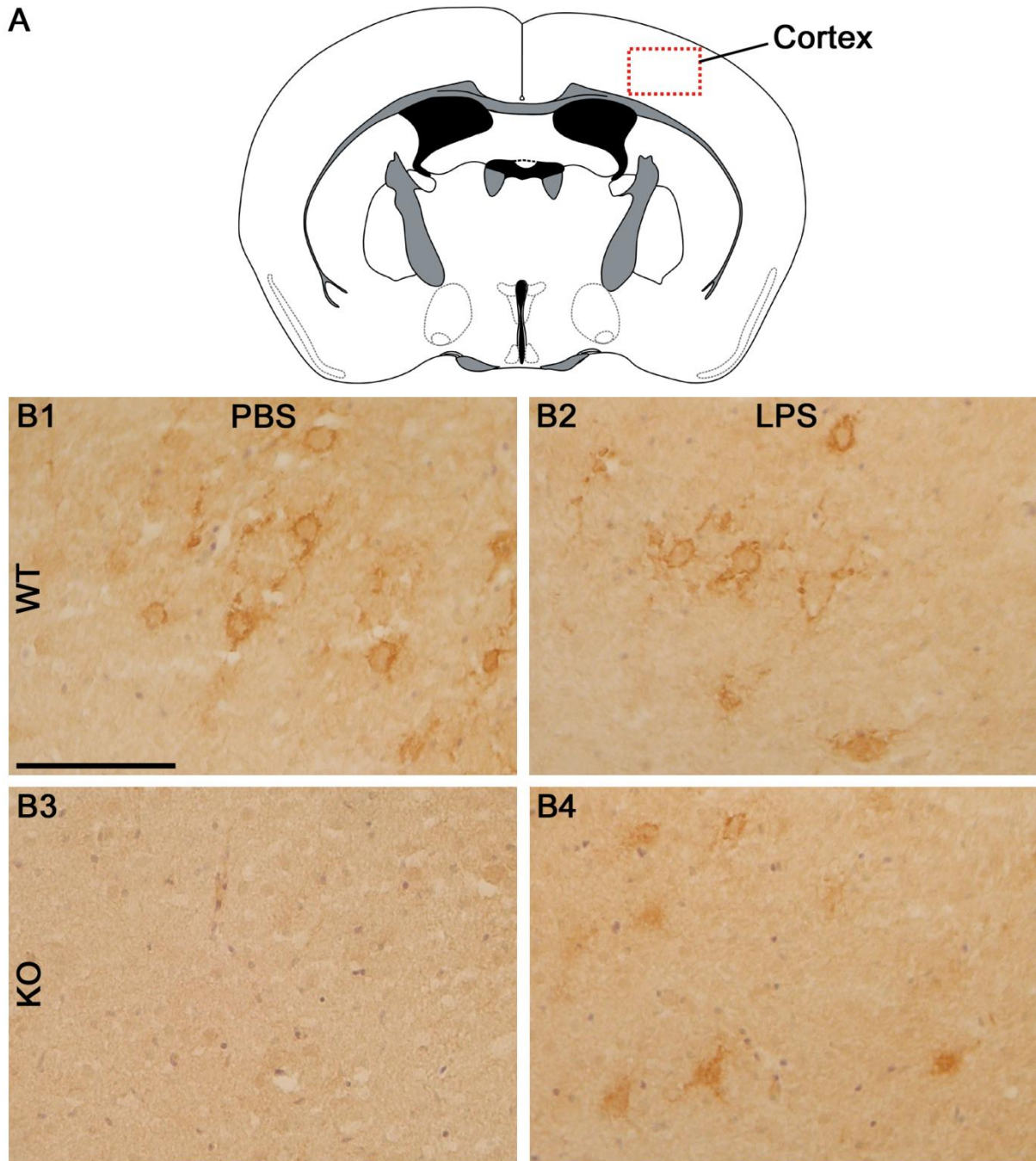


Abbildung III-39

Immunhistochemischer Nachweis des VIPR1 (dunkelbraun) im Cortex (A) 24 h nach Behandlung mit „phosphate-buffered saline“ (PBS) oder 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS). Zellkerne sind violett gefärbt. WT zeigten nach PBS- (B1) und LPS-Behandlung (B2) einige VIPR1-Signale, ebenso wie die LPS-behandelten KO (B4). Die PBS-behandelten KO (B3) hingegen zeigten verminderte VIPR1-Signale. Scale Bar in B1 = 100 μ m – repräsentativ für B1-

B4

6. Veränderungen des Serotonin-Systems in NF-IL6-Knockout-Mäusen

Das Serotonin-System spielt ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Kommunikation zwischen Immunsystem und Gehirn während systemischer Entzündungen sowie „sickness behavior“. Zudem wurde in KMO-defizienten Mäusen eine erhöhte lokomotorische Aktivität nach Amphetamin-Stimulation beobachtet (OConnor 2014), womit sie eine gewisse Ähnlichkeit mit den KO aufweisen, die eine verstärkte Aktivität nach dem NES zeigten. Aus diesen Gründen wurden verschiedene Enzyme des Tryptophan-Metabolismus untersucht.

8 h nach LPS-Stimulation wiesen die WT einen starken Anstieg der hypothalamischen IDO-Expression auf (Abbildung III-40, A). Die KO hingegen zeigten nach LPS-Stimulation im Vergleich zu den WT signifikant geringere IDO-Expression (*post-hoc* $p < 0,001$). Die LPS-induzierte hypothalamische KMO-Expression (B) war in beiden Genotypen gleichermaßen erhöht (Haupteffekt Behandlung $p = 0,0042$). Die TPH2-Expression (C) dagegen wurde in den KO LPS-induziert erhöht (*post-hoc* $p < 0,05$), nicht jedoch in den WT. Auch der Serotonin-Wiederaufnahmetransporter Slc6A4 (D) zeigte in den KO im Vergleich zu den WT erhöhte Expression (Haupteffekt Genotyp $p = 0,0018$).

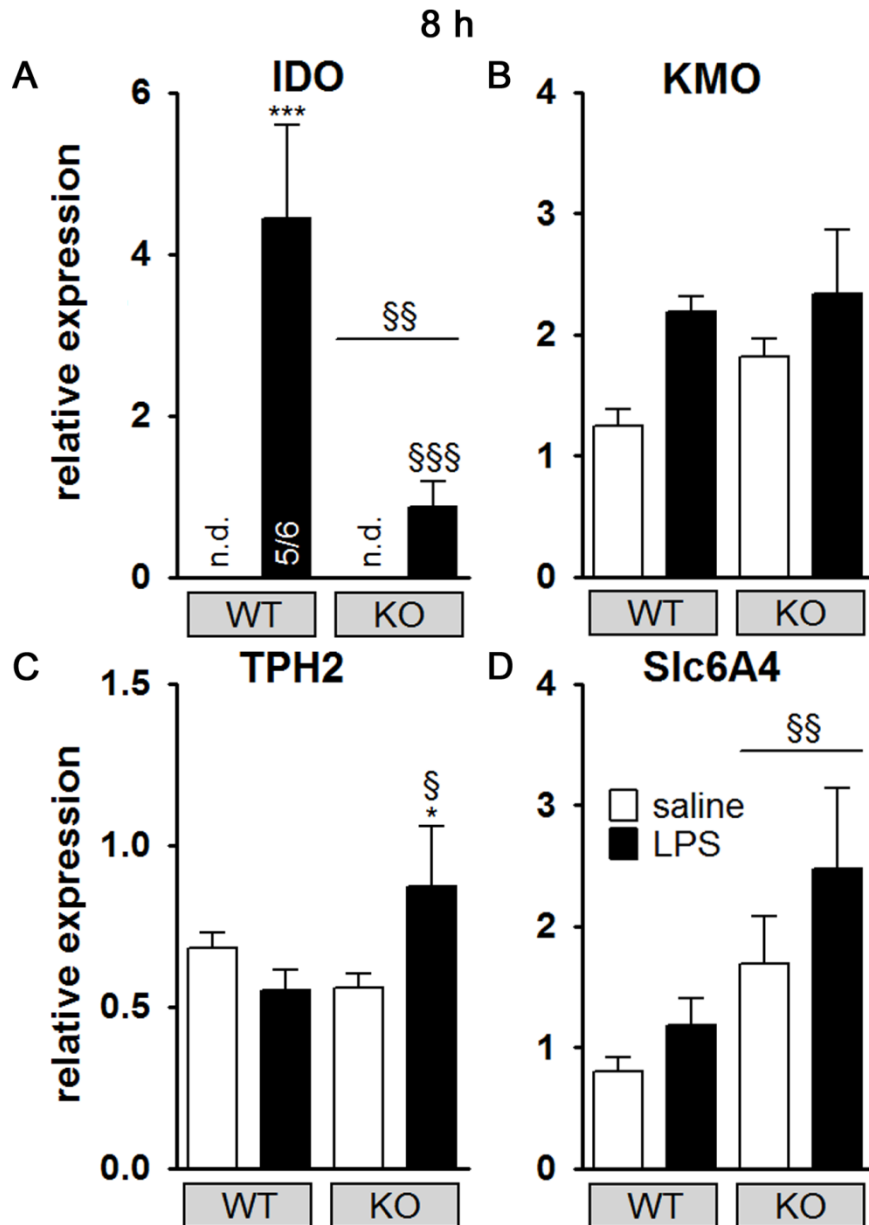


Abbildung III-40

Hypothalamische Expression der Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO, A), Kynurenin-3-Monooxygenase (KMO, B), Tryptophan-Hydroxylase 2 (TPH2, C) und des Serotonin-Wiederaufnahmetransporters Slc6A4 (D) 8 h nach Behandlung mit „phosphate-buffered saline“ (PBS) oder 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS). Die KO zeigten im Vergleich zu den WT verminderte LPS-induzierte IDO-Expression, jedoch erhöhte TPH2- und Slc6A4-Expression. § Haupteffekt Genotyp, § KO vs. WT, * LPS vs. PBS, n.d. = nicht detektierbar, 5/6 = 5 von 6 Proben waren detektierbar

24 h nach der LPS-Stimulation war die IDO in den meisten Proben nicht mehr nachweisbar (Abbildung III-41, A), während die Expression der KMO (B) in den KO

gegenüber den WT erhöht war (Haupteffekt Genotyp $p = 0,0218$). Die Expression der TPH2 (C) ergab 24 h nach der Behandlung keine Einflüsse durch Genotyp oder Behandlung. Der Serotonin-Wiederaufnahmetransporter (D) hingegen war in den KO im Vergleich zu den WT erhöht exprimiert (Haupteffekt Genotyp $p = 0,0003$).

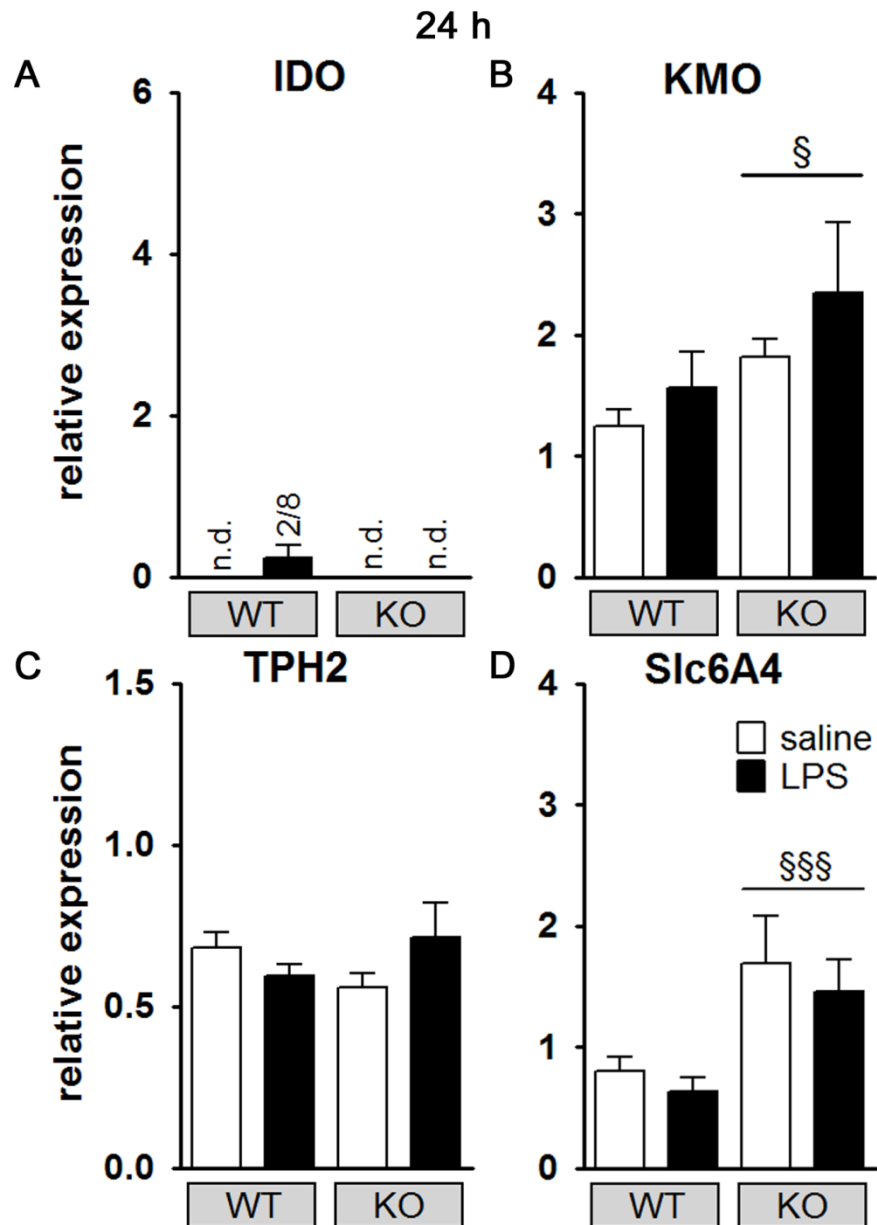


Abbildung III-41

Hypothalamische Expression der Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO, A), Kynurenin-3-Monooxygenase (KMO, B), Tryptophan-Hydroxylase 2 (TPH2, C) und des Serotonin-Wiederaufnahmetransporters Slc6A4 (D) 24 h nach Behandlung mit „phosphate-buffered saline“ (PBS) oder 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS). Die KO zeigten im Vergleich zu den WT

erhöhte Expression der KMO und des Slc6A4. § Haupteffekt Genotyp, § KO vs. WT, * LPS vs. PBS, n.d. = nicht detektierbar, 2/8 = 2 von 8 Proben waren detektierbar

Als weiteres wichtiges Organ für den Tryptophan-Metabolismus wurde außerdem die Leber untersucht (Abbildung III-42). Hier wies die IDO sowohl 8 (A) als auch 24 h (C) nach der LPS-Stimulation erhöhte Expression in beiden Genotypen auf (beide Haupteffekt Behandlung $p < 0,0001$). Während 8 h nach der Stimulation die IDO-Expression in den KO im Vergleich zu den WT noch erhöht war (*post-hoc* $p < 0,01$), war 24 h nach der Behandlung kein Unterschied zwischen den Genotypen feststellbar. Die Expression der KMO in der Leber zeigte 8 h nach der Behandlung (B) eine geringgradige LPS-induzierte Reduktion (Haupteffekt Behandlung $p = 0,0386$), jedoch keine Unterschiede zwischen den Genotypen. 24 h nach der Behandlung hingegen war die Expression der KMO in der Leber durch LPS erhöht (Haupteffekt Behandlung $p = 0,0361$), die Expression in den KO jedoch im Vergleich zu den WT vermindert (Haupteffekt Genotyp $p = 0,0379$).

Zusammenfassend zeigten die KO also im Vergleich zu den WT im Hypothalamus eine höhere LPS-induzierte TPH2-, KMO- und Slc6A4-Expression, jedoch eine geringere IDO-Expression. In der Leber hingegen wiesen die KO gegenüber den WT erhöhte LPS-induzierte IDO- und insgesamt verminderte KMO-Expression auf.

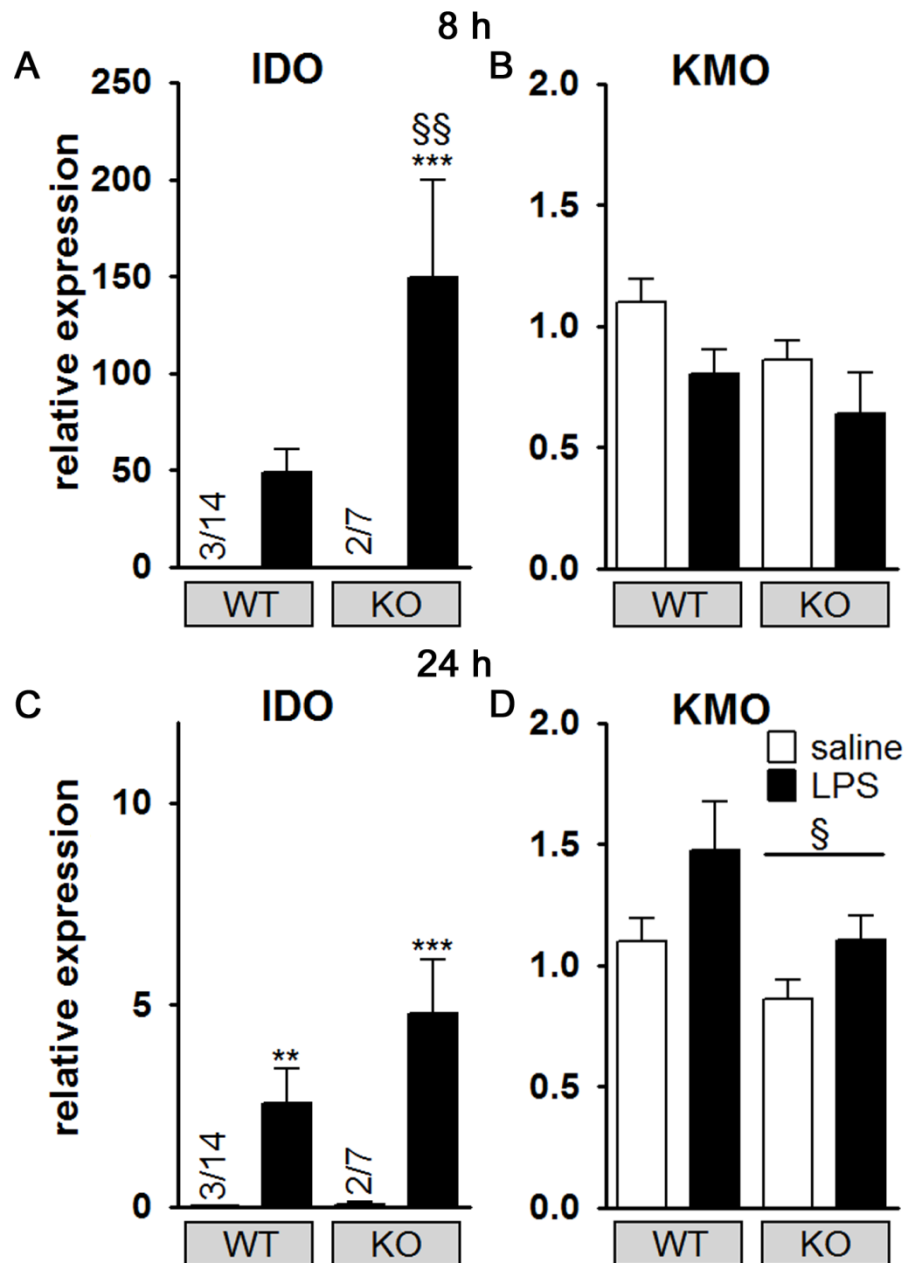


Abbildung III-42

Expression der Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO, A und C) und der Kynurenin-3-Monooxygenase (KMO, B und D) 8 (A und B) und 24 h (C und D) nach Behandlung mit „phosphate-buffered saline“ (PBS) oder 2,5 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS) in der Leber. Die KO zeigten im Vergleich zu den WT erhöhte IDO-Expression 8 h nach LPS-Stimulation jedoch verminderte KMO-Expression 24 h nach beiden Behandlungen. § Haupteffekt Genotyp, § KO vs. WT, * LPS vs. PBS, 3/14 = 3 von 14 Proben waren detektierbar

IV. Diskussion

1. Rolle von NF-IL6 für Fieber und die „sickness response“

Mit den Untersuchungen dieser Arbeit konnte zum ersten Mal detailliert gezeigt werden, dass NF-IL6-Knockout Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen eine reduzierte Entzündung 8 h jedoch eine verstärkte Entzündung 24 h nach einer hohen LPS-Dosis aufweisen.

3 bis 7 h nach Stimulation mit der hohen LPS-Dosis war die Fieberreaktion der KO deutlich reduziert, jedoch nach Stimulation mit der niedrigen LPS-Dosis tendenziell verlängert (24 h). Laut einer früheren Studie besitzen KO Defizite in der Thermoregulation und erhöhte Kälteempfindlichkeit (Carmona et al. 2005). Eine andere Studie hingegen beschreibt einen erhöhten Energieumsatz der KO insbesondere bei fettreicher Ernährung (Millward et al. 2007). Um eventuellen Veränderungen des Wärmehaushalts der KO Rechnung zu tragen, wurden die Tiere in der hier vorliegenden Studie bei thermoneutralen 31°C gehalten. Das Vorkommen eines normalen zirkadianen Rhythmus der Körpertemperatur zusammen mit der insbesondere nächtlich verminderten Aktivität spricht dabei tatsächlich für einen bedingt erhöhten Energieumsatz im Vergleich zu den WT. Da die Körpertemperatur der KO sich jedoch basal nicht von der der WT unterschied, sind die KO also unter thermoneutralen Bedingungen zu einer normalen Thermoregulation und, nach Stimulation mit der niedrigen LPS-Dosis, zu einer normalen bzw. tendenziell sogar verlängerten Fieberreaktion fähig. Die reduzierte Fieberreaktion nach Injektion der hohen LPS-Dosis scheint also keine Folge einer prinzipiell defekten Thermoregulation zu sein.

Vielmehr ging diese reduzierte Fieberantwort der KO 3 bis 7 h nach der hohen LPS-Dosis mit, im Vergleich zu den LPS-behandelten WT, verminderten IL-6- und IL-10-Plasmaspiegeln sowie verminderter hypothalamischer Expression der inflammatorischen Mediatoren IL-6, TNF α , SOCS3, I κ B α , mPGES und iNOS 8 h nach der LPS-Behandlung einher. Auch die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten ins SFO war in den KO zu diesem Zeitpunkt vermindert. Die KO

zeigten also, zusätzlich zu dem reduzierten Fieber, 8 h nach der hohen LPS-Dosis eine reduzierte Entzündungsreaktion.

24 h nach LPS-Stimulation hingegen wiesen die KO im Vergleich zu den WT erhöhte IL-6- und IL-10-Plasmaspiegel sowie verstärkte Expression der Mediatoren IL-1 β , IL-6, TNF α , IL-1ra, IL-10, SOCS3, I κ B α und COX2 auf. Die beobachtete Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten zum Gehirn (lediglich für die *fimbria hippocampi* erhöht) sowie die Fieberreaktion ergaben 24 h nach Stimulation mit der hohen LPS-Dosis keine unterscheidbare Reaktion zwischen KO und WT. Dass trotz der erhöhten Expression inflammatorischer Mediatoren kein erhöhtes Fieber in den KO 24 h nach LPS-Injektion auftrat, könnte durch eine physiologische Begrenzung der Fieberantwort erklärt werden (Mackowiak 1998). Die Höhe des LPS-induzierten Fiebers ist Dosis-abhängig, ab einer gewissen Höhe des Fiebers werden jedoch gegen-regulatorische Mechanismen aktiviert, so dass das Fieber nicht weiter ansteigt („ceiling effect“). Die hohe LPS-Dosis könnte dazu geführt haben, dass dieser Maximalwert des Fiebers bereits erreicht wurde, so dass die verstärkte Inflammation der KO keine weitere Erhöhung bewirken konnte.

Die vorliegende Arbeit demonstriert also zum ersten Mal eine zweigeteilte Rolle von NF-IL6 für das Entzündungsgeschehen: 8 h nach einer hohen LPS-Dosis vermittelt NF-IL6 pro-inflammatorische Effekte, während seine Wirkung 24 h nach LPS-Stimulation eher anti-inflammatorische Effekte umfasst.

Nach Injektion der niedrigen LPS-Dosis wurde eine tendenzielle Verlängerung der Fieberphase in den KO und keine Veränderung der frühen Fieberphase beobachtet. Da in dieser Studie keine Messungen inflammatorischer Mediatoren nach der niedrigen LPS-Dosis durchgeführt wurden, kann nicht geklärt werden, ob die beobachtete duale Rolle von NF-IL6 für das Entzündungsgeschehen auch nach der niedrigen LPS-Dosis auftritt oder LPS-Dosis-abhängig unterschiedlich ist.

Die beobachteten Abweichungen der Entzündungsreaktion und des Fiebers der KO umfassen auch Veränderungen der Mediatoren des humoralen und zellulären Kommunikationswegs. Dabei gibt es aufgrund der hier gewonnenen neuen Ergebnisse

in Zusammenhang mit der aktuellen Literatur mehrere potentielle Mechanismen, wie NF-IL6 Fieber und Inflammation beeinflussen könnte (Abbildung IV-1). Diese werden im Folgenden näher betrachtet.

1.1 Beeinflussung des humoralen Kommunikationswegs durch NF-IL6

Wie sein Name erkennen lässt, wurde NF-IL6 ursprünglich als Transkriptionsfaktor, der an der IL-6-Expression beteiligt ist, beschrieben (Akira et al. 1990; Akira et al. 1992). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte eine Beteiligung von NF-IL6 an der peripheren und zentralen IL-6-Expression nachgewiesen werden. IL-6 ist eines der wichtigsten zirkulierenden Zytokine für die Fieberantwort und die „sickness response“ (Cartmell et al. 2000). Es beeinflusst direkt die sensorischen CVO (Harre et al. 2002) sowie die Gehirn-Endothelzellen (Rummel et al. 2005; Eskilsson et al. 2014) und kann so zu einer STAT3-abhängigen Induktion der COX2 und der mPGES beitragen (Rummel et al. 2006; Rummel et al. 2011). Zirkulierende IL-6-Spiegel korrelieren direkt mit der Fieberantwort (LeMay et al. 1990). Da die KO 8 h nach LPS-Stimulation gegenüber den WT geringere IL-6-Plasmalevel aufwiesen, ist es sehr wahrscheinlich, dass die KO bereits auch vorher verminderte IL-6-Spiegel zeigten. Dies ist eine mögliche Erklärung für die beobachtete reduzierte Fieberantwort der KO.

Auch Hinweise für eine Beteiligung von NF-IL6 an der Expression zweier weiterer wichtiger Zytokine, nämlich IL-1 β und TNF α , konnten in der vorliegenden Arbeit gewonnen werden. Dieser Effekt könnte sowohl direkt durch Bindung von NF-IL6 an den Promotor der Zytokine (Akira et al. 1990; Zhang und Rom 1993) als auch indirekt durch Beeinflussung anderer Transkriptionsfaktoren durch NF-IL6 vermittelt sein (Agrawal et al. 2003; Uskokovic et al. 2012). Die Expression von IL-1 β wird dabei jedoch anscheinend nur im ZNS durch NF-IL6 beeinflusst, da peripher keine Unterschiede zwischen den Genotypen festgestellt wurden. Die TNF α -Expression hingegen war im Hypothalamus der KO 8 h nach LPS-Stimulation gegenüber den WT reduziert, 24 h nach LPS-Stimulation jedoch erhöht, wohingegen in der Leber 8 h nach LPS-Stimulation vermehrte TNF α -Expression festgestellt wurde. Die Rolle von TNF α für die Entzündungsreaktion ist sehr komplex und umstritten und kann zentral und peripher unterschiedlich ausfallen. TNF α kann über den TNFR I pro-, über den TNFR

II hingegen anti-inflammatorisch wirken (siehe Kapitel I.2.1.1.1). Inhibition von TNF α kann außerdem LPS-induzierte Hypothermie verkürzen (Tollner et al. 2000). Da die Körperkerntemperatur der KO 3 bis 7 h nach LPS-Stimulation jedoch nur auf annähernd basale Werte, nicht jedoch darunter gefallen war, ist eine LPS-induzierte Hypothermie als Begründung für die gegenüber den LPS-behandelten WT verminderte Temperatur unwahrscheinlich. Es ist jedoch auch beschrieben, dass peripheres TNF α eine antipyretische Wirkung entwickeln kann (Klir et al. 1995; Kozak et al. 1995). Ob TNF α zum Zeitpunkt der reduzierten Fieberantwort der KO (3 – 7 h) tatsächlich erhöht war ist leider nicht bekannt und könnte in zukünftigen Studien untersucht werden. Die erhöhte TNF α -Expression in der Leber ist allerdings ein Hinweis auf erhöhte TNF α -Plasmakonzentrationen zu früheren Zeitpunkten, die zu der reduzierten Fieberantwort der KO beitragen könnten.

Die Expression der anti-inflammatorischen Zytokine IL-10 und IL-1ra, die als kompensatorische Mechanismen während systemischer Entzündungen induziert werden, wurde ebenfalls durch NF-IL6 beeinflusst. IL-10 werden anti-inflammatorische und antipyretische Wirkungen zugesprochen. Gabe von rekombinantem IL-10 schützt Mäuse vor LPS-induziertem Fieber (Leon et al. 1999). Neutralisation des IL-10 bzw. IL-10-Defizienz hingegen verstärkt die Fieberantwort nach einer niedrigen LPS-Dosis und führt nach einer hohen LPS-Dosis zu verstärkter Hypothermie und erhöhter Letalität (Leon et al. 1999; Harden et al. 2014). Da die IL-10-Plasmalevel der KO 8 h nach LPS-Stimulation gegenüber den WT verringert waren, ist IL-10 wahrscheinlich nicht an der reduzierten Fieberantwort der KO 3 – 7 h nach LPS-Behandlung beteiligt. 24 h nach LPS-Behandlung hingegen war die Expression von IL-10 und IL-1ra im Hypothalamus der KO im Vergleich zu den WT erhöht. Dies könnten gegenregulatorische Mechanismen zur Begrenzung der Höhe des LPS-induzierten Fiebers sein („ceiling effect“, siehe oben).

Der Einfluss von NF-IL6 auf die PGE₂-Synthese hingegen erscheint komplexer als ursprünglich angenommen. Die Expression der geschwindigkeitsbestimmenden Enzyme der PGE₂-Synthese, COX2 und mPGES, insbesondere in den Gehirn-Endothelzellen ist essentiell für die Entstehung der Fieberantwort (Wilhelms et al.

2014). Eine Beteiligung von NF-IL6 an der mPGES-Expression in Makrophagen (Uematsu et al. 2002) und aktivierten Mikroglia (Straccia et al. 2013) wurde bereits nachgewiesen. Straccia und Kollegen (2013) konnten dabei eine Verminderung der mPGES-Expression nach LPS-Stimulation in KO, jedoch keinen Einfluss von NF-IL6 auf die COX2-Expression beobachten (Straccia et al. 2013). In der vorliegenden Studie wurde ebenfalls eine, im Vergleich zu den WT, reduzierte hypothalamische mPGES-Expression 8 h nach LPS-Stimulation in den KO nachgewiesen, was die Beteiligung von NF-IL6 an der mPGES-Expression im Gehirn bestätigt. Da zirkulierendes IL-6 an der mPGES-Expression beteiligt ist (Rummel et al. 2011), könnte diese Beobachtung aber auch mit den reduzierten IL-6-Plasmaspiegeln in den KO zu diesem Zeitpunkt zusammen hängen. mPGES-defiziente Mäuse zeigen eine stark reduzierte Fieberantwort (Saha et al. 2005). Die verringerte mPGES-Expression zum 8 h Zeitpunkt könnte also ebenfalls eine Ursache der verminderten Fieberreaktion in den KO darstellen. Dass die KO jedoch generell in der Lage sind Fieber zu entwickeln, spricht dafür, dass andere Transkriptionsfaktoren wie z. B. NFκB oder STAT3 ebenfalls an der basalen oder LPS-induzierten mPGES-Expression beteiligt sind. Die Expression der COX2 war 8 h nach LPS-Stimulation in den KO unverändert, während auf Proteinebene verminderte COX2-Immunreaktivität nachgewiesen wurde. NF-IL6-Defizienz scheint also zumindest indirekt auch die COX2 zu beeinflussen. 24 h nach der LPS-Stimulation war die mPGES-Expression der KO nicht mehr unterschiedlich zu der der WT. Stattdessen wiesen die KO gegenüber den WT erhöhte COX2-Expression auf. Die Regulation der PGE2-Synthese durch NF-IL6 ist also weit komplexer, als bisher angenommen. Eine weitere kürzlich veröffentlichte Studie demonstrierte außerdem, dass NF-IL6 auch über Induktion der COX1 die PGE2-Synthese beeinflussen kann (Bi et al. 2014). Dabei wurde in einem *in vitro*-Modell festgestellt, dass PRRSV (porcines reproduktives und respiratorisches Syndrom Virus)-Infektionen zu einer erhöhten COX1- und NF-IL6-Expression sowie zu einer erhöhten PGE2-Synthese führen. Selektive Hemmung der COX1 hingegen verhinderte den Anstieg des PGE2. Hemmung der NF-IL6-Aktivität durch spezifische siRNAs reduzierte den PRRSV-induzierten Anstieg der COX1-Expression. Auch die Bindung von NF-IL6 an den COX1-Promotor wurde nachgewiesen. Ob dieser Mechanismus

auch bei bakteriellen Entzündungen eine Rolle spielen könnte, muss jedoch noch untersucht werden. Insgesamt lassen diese Beobachtungen in KO also 8 h nach LPS-Stimulation eine reduzierte, 24 h nach LPS-Stimulation jedoch eine erhöhte PGE₂-Synthese erwarten, was ebenfalls die reduzierte Inflammation der KO 8 h bzw. die verstärkte Inflammation 24 h nach LPS-Applikation widerspiegelt.

Auch eine Bindungsstelle für NF-IL6 am iNOS-Promotor wurde bereits beschrieben (Dlaska und Weiss 1999). In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls eine Beeinflussung der iNOS-Expression durch NF-IL6 bestätigt. Die iNOS-Expression der KO 8 h nach LPS-Stimulation war im Vergleich zu den WT verringert. Tatsächlich ist die Fieberantwort in iNOS-defizienten Mäusen reduziert (Kozak und Kozak 2003). Der fehlende LPS-induzierte Anstieg der iNOS könnte also eine weitere Erklärung für das reduzierte Fieber in den KO darstellen. Es ist außerdem beschrieben, dass die iNOS an der LPS-induzierten Anorexie beteiligt ist (Riediger et al. 2010). Dieses Ergebnis konnte in der vorliegenden Studie allerdings nicht bestätigt werden, da die Reduktion der iNOS-Expression in den KO nicht mit einer Änderung der LPS-induzierten Anorexie einherging.

NF-IL6 beeinflusst den humoralen Kommunikationsweg zum Gehirn also auf verschiedenen Stufen, wobei er 8 h nach LPS-Stimulation eher pro-, 24 h nach LPS-Stimulation hingegen anti-inflammatorische Effekte vermittelt.

1.2 Beeinflussung des zellulären Kommunikationswegs durch NF-IL6

Es ist bereits bekannt, dass NF-IL6 für die angeborene und die erworbene Immunantwort wichtig ist (Screpanti et al. 1995). In der Tat zeigten die KO nach Implantation der Radiotransmitter eine verstärkte Fremdkörperreaktion, die sich durch die Bildung einer flüssigkeitsgefüllten Kapsel um den Sender äußerte, die bei den WT nicht auftrat. NF-IL6 scheint auf die Fremdkörperreaktion somit also eine anti-inflammatorische Wirkung zu haben. Die Injektion von LPS induzierte in den KO hingegen eine Neutrophilie, was eine normale, zu erwartende Reaktion darstellt. Hier schien die Immunantwort der KO also nicht beeinträchtigt zu sein.

Zusätzlich zu der reduzierten Expression inflammatorischer Mediatoren 8 h nach LPS-Behandlung war in den KO zu diesem Zeitpunkt auch die Einwanderung NG ins SFO vermindert. Dies war höchstwahrscheinlich durch eine reduzierte hypothalamische Expression des Neutrophilen-spezifischen Chemokins CXCL1 verursacht. In CXCL1-defizienten Mäusen ist die Rekrutierung von NG zum Ort einer Entzündung verringert, wie z. B. in einem Kolitis-Modell demonstriert wurde (Shea-Donohue et al. 2008). Es ist jedoch auch möglich, dass auch Adhäsionsmoleküle an dieser verminderten Rekrutierung der NG in den KO beteiligt sind. Einige Adhäsionsmoleküle werden z. B. durch NFκB reguliert (Lee et al. 1996) und tatsächlich wurde in dieser Arbeit auch eine Beeinflussung der NFκB-Aktivität in den NF-IL6-defizienten Tieren nachgewiesen. Es ist zudem beschrieben, dass auch zentral im Gehirn gebildetes IL-1β zur Einwanderung NG ins Gehirn bei systemischen Entzündungen z. B. über Regulation der ICAM1-Expression beiträgt (Fabry et al. 1992; Bohatschek et al. 2001; Proescholdt et al. 2002). Da die zentrale IL-1β-Expression 8 h nach LPS-Behandlung in den KO jedoch nicht verändert war, scheint dieser Weg nicht an der verminderten Einwanderung NG in den KO beteiligt zu sein. 24 h nach LPS-Behandlung zeigten die KO leicht erhöhte CXCL1-Expression im Vergleich zu den WT, die Anzahl der NG war jedoch in den meisten Gehirnstrukturen in den KO nicht verändert. Lediglich die *fimbria hippocampi* wiesen eine deutlich erhöhte Anzahl NG auf. Da die *fimbria hippocampi* Bestandteil des limbischen Systems sind, wäre hier eine Beeinflussung von Emotionen, Antrieb und Lernprozessen durch die NG denkbar. Tatsächlich wurde bereits eine Beteiligung von NG an LPS-induzierten Verhaltensänderungen beschrieben (Aguilar-Valles et al. 2014). Die genaue Bedeutung dieses Ergebnisses konnte jedoch nicht geklärt werden und bleibt in zukünftigen Studien als interessanter Nebenfund weiter aufzuklären.

In den WT zeigte ein großer Anteil der ins Gehirn eingewanderten NG insbesondere 8 h nach LPS-Stimulation auch NF-IL6-Immunreaktivität. NF-IL6 ist in NG an der Produktion inflammatorischer Zytokine beteiligt (Cloutier et al. 2009; Mayer et al. 2013). Die verminderte Anzahl NG im Gehirn der KO 8 h nach LPS-Stimulation im Vergleich zu den WT sowie das Fehlen von NF-IL6 in diesen NG könnte also zur

verminderten Expression inflammatorischer Zytokine im Hypothalamus der KO beitragen.

In einer früheren Studie war bereits eine generelle Reduktion der NG im Gehirn der KO nach ischämischen Hirnschädigungen beobachtet worden (Kapadia et al. 2006). Dass in der vorliegenden Arbeit nur eine vorübergehende Verminderung der NG im Gehirn der KO festgestellt wurde, könnte durch die unterschiedlichen verwendeten Versuchsmodelle erklärt werden und gibt außerdem einen Hinweis darauf, dass die Regulation der Neutrophilen-Einwanderung ins Gehirn bei systemischen Entzündungen komplexer reguliert ist als bisher angenommen wurde. NG können zur Neurotoxizität beitragen (Dinkel et al. 2004), die KO sind jedoch vor Neurotoxizität nach Exzitotoxizität (Cortes-Canteli et al. 2008) und Ischämie (Kapadia et al. 2006) geschützt. In einer weiteren Studie konnte jedoch auch demonstriert werden, dass NG einen positiven Effekt auf die Regeneration von Nervengewebe haben können (Stirling et al. 2009). So war in Mäusen nach Depletion der NG die Heilung nach Rückenmarks-Schädigungen stark beeinträchtigt. Die genauere Klärung der Funktion von NG sowie ihrer Regulationsmechanismen sind also von großem Interesse. Auch konnte kürzlich eine Beteiligung von NG an LPS-induziertem depressiven Verhalten festgestellt werden (Aguilar-Valles et al. 2014).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde also zusätzlich eine Studie an neutropenen und normalen Mäusen durchgeführt. 48 h nach LPS-Stimulation war die hypothalamische CXCL1-Expression der neutropenen Tiere dabei im Vergleich zu den immunkompetenten Tieren vermindert. Dies bestätigt die Vermutung, dass Neutrophile über Expression von Chemokinen verstärkend auf ihr eigene Rekrutierung wirken (Scapini et al. 2000). Des Weiteren zeigten die neutropenen Tiere tendenziell keinen LPS-induzierten Anstieg der hypothalamischen IL-10-Expression. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass NG im Gehirn über die Produktion von IL-10 auch eine anti-inflammatorische Rolle spielen können. Da die NF-IL6-Immunreaktivität in verschiedenen Gehirnstrukturen der neutropenen Tiere reduziert war und eine NF-IL6-Bindungsstelle am IL-10-Promotor bekannt ist (Liu et al. 2003), könnte NF-IL6 an diesem Prozess beteiligt sein. Für eine anti-inflammatorische Rolle der NG spricht

zudem, dass neutropene Tiere verstärktes und verlängertes LPS-induziertes Fieber aufweisen (Tavares et al. 2006) und dass in neutropenen Tieren der vorliegenden Studie eine vermehrte NF-IL6- und IL-6-Expression im Cortex nachgewiesen werden konnte. Auch die KO zeigten nach der niedrigen LPS-Dosis eine tendenziell verlängerte Fieberreaktion. Da in dieser Arbeit demonstriert wurde, dass NF-IL6 an der Rekrutierung von NG ins Gehirn beteiligt ist, könnte auch eine verminderte Einwanderung von NG in die Gehirne der KO nach der niedrigen LPS-Dosis an der tendenziell verlängerten Fieberantwort der Tiere beteiligt sein. Da jedoch keine Untersuchungen nach Behandlung mit der niedrigen LPS-Dosis möglich waren, konnte dies nicht abschließend geklärt werden. Weitere Untersuchungen sollten hierfür durchgeführt werden. Neutropenie im Rahmen von chemotherapeutischen Behandlungen kommt sehr häufig vor und einige der damit zusammenhängenden Nebenwirkungen könnten möglicherweise auch mit einer in der vorliegenden Arbeit postulierten anti-inflammatorischen Rolle von NG in Zusammenhang stehen.

Neben den NG spielen auch perivaskuläre Makrophagen eine wichtige Rolle bei der Kommunikation zwischen Immunsystem und Gehirn. Aus diesem Grund wurde die CD163-Expression und –Immunreaktivität im Hypothalamus der Tiere untersucht. CD163 wird im Gehirn hauptsächlich von perivaskulären Makrophagen exprimiert. Bei chronischen Entzündungen ist jedoch auch eine Expression von CD163 in aktivierten Mikroglia beschrieben worden (Borda et al. 2008). Obwohl in der vorliegenden Arbeit keine chronischen Veränderungen untersucht wurden, kann also nicht sicher ausgeschlossen werden, dass der CD163-Antikörper vielleicht auch aktivierte Mikroglia detektiert. Aufgrund des untersuchten Zeitpunkts und der Tatsache, dass CD68, ein weiterer Marker für aktivierte Mikroglia, keine LPS- oder Genotyp-induzierten Unterschiede aufwies, ist es jedoch sehr wahrscheinlich, dass die beobachteten Effekte tatsächlich auf Veränderungen in den perivaskulären Makrophagen zurückzuführen sind. In den WT wurde ein LPS-induzierter Anstieg der CD163-Expression im Hypothalamus sowie der CD163-Immunreaktivität im SFO nachgewiesen. Damit konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal eine LPS-induzierte erhöhte Anzahl perivaskulärer Makrophagen in einem CVO nachgewiesen werden.

Dieser Effekt scheint LPS-Dosis-abhängig zu sein und nur bei sepsisartigen Entzündungsreaktionen aufzutreten, da bei einer Zeitverlaufsstudie in Ratten nach 50 µg/kg und 1 mg/kg LPS keine Veränderungen der perivaskulären Makrophagen in den CVO nachgewiesen werden konnten (Rummel et al., unveröffentlichte Daten). Die KO hingegen zeigten bereits basal gegenüber den WT deutlich erhöhte perivaskuläre Makrophagen im SFO. Eine Depletion von perivaskulären Makrophagen führt zu einer erhöhten LPS-induzierten PGE₂-Produktion (Serrats et al. 2010). Die erhöhte Anzahl potentiell entzündungshemmender perivaskulärer Makrophagen sowohl in LPS-behandelten WT als auch in KO könnte also eine kompensatorische anti-inflammatorische Rolle spielen. NF-IL6 ist in Makrophagen an der Expression verschiedener inflammatorischer Zytokine (Yan et al. 2012) sowie maßgeblich an der Expression der iNOS beteiligt (Screpanti et al. 1995). NO wiederum hemmt die Expression des für die Chemotaxis von Makrophagen wichtigen „macrophage chemoattractant protein“ (MCP)-1 in Endothelzellen (Zeiber et al. 1995). Das Fehlen dieses negativen Rückkopplungsmechanismus in den KO könnte also ebenfalls eine Erklärung für die vermehrte Rekrutierung perivaskulärer Makrophagen in den Gehirnen der KO darstellen.

NF-IL6 ist also sowohl an der durch NG als auch an der durch perivaskuläre Makrophagen vermittelten zellulären Kommunikation zwischen Immunsystem und Gehirn beteiligt.

1.3 Beeinflussung anderer Transkriptionsfaktoren durch NF-IL6

Im Rahmen des sogenannten „cross talk“ können verschiedene Transkriptionsfaktoren miteinander interagieren und so gemeinsam die Expression verschiedener Gene regulieren (siehe auch Kapitel I.3.4). Es ist jedoch auch eine indirekte gegenseitige Beeinflussung der Transkriptionsfaktoren möglich. NF-IL6 kann z. B. die Expression des IκBα, des Inhibitors des NFκB, hemmen. So wurde in NF-IL6-defizienten Makrophagen *in vitro* nach LPS-Stimulation eine im Vergleich zu WT-Makrophagen erhöhte Expression des IκBα festgestellt. Dies führte zu einer verminderten NFκB-Aktivität. Überexpression des NF-IL6 hingegen reduzierte die IκBα-Expression und steigerte somit die NFκB-Aktivität (Cappello et al. 2009). In der vorliegenden Arbeit

wurde eine Verminderung des I κ B α 8 h und eine Erhöhung 24 h nach LPS-Stimulation in den KO im Vergleich zu den WT beobachtet. Da in den KO die Hemmung der I κ B α -Expression durch NF-IL6 entfällt, die Expression 8 h nach LPS-Behandlung aber dennoch niedriger ist als in den WT, ist dieser Effekt höchstwahrscheinlich auf eine direkte Beeinflussung der NF κ B-Aktivität durch das Fehlen von NF-IL6 zurückzuführen. Da I κ B α ein Zielgen des NF κ B ist, ist die verminderte Expression des I κ B α in den KO 8 h nach LPS-Stimulation ein Indiz für geringere NF κ B-Aktivität. Die höhere I κ B α -Expression 24 h nach LPS-Behandlung in den KO könnte hingegen durch erhöhte NF κ B-Aktivität oder durch die fehlende Hemmung der I κ B α -Expression durch NF-IL6 bedingt sein. *In vivo* scheint die Regulation der NF κ B-Aktivität also deutlich komplexer zu sein, als die *in vitro*-Studie von Cappello und Kollegen (2009) vermuten lässt.

Für den STAT3-Inhibitor SOCS3 ist interessanterweise beschrieben, dass er durch NF-IL6 induziert wird. In humanen Endothelzellen ebenso wie in murinen Fibroblasten konnte die Bindung von NF-IL6 an den SOCS3-Promotor nachgewiesen werden. NF-IL6-Defizienz hingegen führte zu einer deutlichen Reduktion der SOCS3-Expression (Yarwood et al. 2008). In der vorliegenden Arbeit zeigte SOCS3 jedoch ein ähnliches Expressionsmuster wie I κ B α mit im Vergleich zu den WT verminderter Expression 8 h und erhöhter Expression 24 h nach LPS-Behandlung. Auch hier kann dies durch eine direkte Beeinflussung von SOCS3 durch NF-IL6 oder durch einen indirekten Effekt über die STAT3-Aktivierung vermittelt sein. Die geringere SOCS3-Expression in den KO 8 h nach LPS-Behandlung könnte also durch die fehlende Induktion der SOCS3-Expression durch NF-IL6 bedingt sein. Es ist jedoch auch möglich, dass durch eine fehlende Beeinflussung der STAT3-Aktivität durch NF-IL6 die STAT3-Aktivität verringert ist und dadurch weniger SOCS3 gebildet wird. Für diese Möglichkeit spricht außerdem, dass 8 h nach LPS-Behandlung auf Proteinebene im Gehirn weniger STAT3 in den KO als in den WT nachgewiesen werden konnte und STAT3-aktivierende IL-6- und IL-10-Spiegel niedriger waren. Die erhöhte SOCS3-Expression 24 h nach der LPS-Stimulation war wahrscheinlich ebenfalls durch veränderte STAT3-Aktivität vermittelt (z. B. durch mehr zirkulierendes IL-6), es wäre jedoch auch eine

Regulation der SOCS3-Expression durch andere Transkriptionsfaktoren möglich. NFκB und STAT3 sind an der Expression verschiedener inflammatorischer Gene beteiligt: NFκB reguliert z. B. die Expression von IL-6 (LeClair et al. 1992; Matsusaka et al. 1993) und COX2 (Kozak et al. 2006); STAT3 die Expression von IL-10 und iNOS (Lai et al. 2009) sowie von mPGES (Rummel et al. 2011). Auch eine Beteiligung von STAT3 an der COX2-Expression wurde bereits beschrieben (Rummel et al. 2006). Da der COX2-Promotor jedoch keine Bindungsstelle für STAT3 aufweist, ist dieser Effekt wahrscheinlich über eine Beteiligung von bzw. Interaktion („cross-talk“) mit anderen Transkriptionsfaktoren vermittelt. Die Beeinflussung der NFκB- und STAT3-Aktivität bzw. ihre fehlende Interaktion mit NF-IL6 könnten also auch an den Veränderungen der Expression der inflammatorischen Mediatoren in den KO beteiligt sein. Eine solche Interaktion zwischen den Transkriptionsfaktoren wurde z. B. bereits für die Induktion der Akute Phase Proteine beobachtet. STAT3 und NF-IL6 besitzen jeweils eine Bindungsstelle am Promotor des C-reaktiven Proteins, während für NFκB keine solche Bindungsstelle bekannt ist. Dennoch führt Überexpression des NFκB durch Interaktion mit NF-IL6 und STAT3 zu einer erhöhten Expression des C-reaktiven Proteins (Agrawal et al. 2003). STAT3 wurde in einigen Studien außerdem bereits anti-inflammatorische Effekte zugesprochen (Kano et al. 2003; Fielding et al. 2008). NF-IL6 könnte hier also eine synergistische Wirkung aufweisen.

1.4 Mögliche Beeinflussung der NF-IL6-Aktivität

Diese Arbeit demonstriert zum ersten Mal, dass NF-IL6 eine duale Rolle während der Entzündungsreaktion spielt: erst eine pro-inflammatorische, dann eine anti-inflammatorische Rolle. Im Laufe der Entzündungsreaktion muss die Aktivität von NF-IL6 also beeinflusst werden. Ein möglicher Modulator der NF-IL6-Aktivität ist Trib1. Trib1-defiziente Mäuse zeigen eine Überexpression von NF-IL6 sowie verstärkte LPS-induzierte Expression verschiedener inflammatorischer Mediatoren (Yamamoto et al. 2007). Trib1 ist also ein Inhibitor des NF-IL6. In dieser hier vorliegenden Arbeit wurde 8 h nach LPS-Stimulation erhöhte Trib1-Expression in beiden Genotypen, ansonsten jedoch kein Unterschied festgestellt. Da NF-IL6 zu diesem Zeitpunkt anscheinend pro-inflammatorisch wirkt, könnte die erhöhte Trib1-

Expression eine kompensatorische, modulierende Rolle spielen. Eine Beteiligung von Trib1 an der zweigeteilten Rolle von NF-IL6 während der Entzündungsreaktion ist jedoch eher unwahrscheinlich. Da aber auf Proteinebene keine Untersuchung möglich war, ist eine solche Beteiligung von Trib1 an der Regulation der NF-IL6-Aktivität nicht völlig auszuschließen.

Die miR155 ist ebenfalls ein Inhibitor der NF-IL6-Aktivität. Während die miR155 die Expression von NF-IL6 hemmt, führt Inhibition der miR155 *in vitro* in Makrophagen ebenso wie *in vivo* zu einer verstärkten LPS-induzierten NF-IL6-Aktivierung (Worm et al. 2009). Zudem wirkt die miR155 durch Hemmung von Matrix-Metalloproteinasen neuroprotektiv (Faraoni et al. 2009). Auch eine Beteiligung an der T- und B-Zell-Funktion, der Antikörper-Produktion und der Verbindung zwischen angeborener und spezifischer Immunantwort ist beschrieben (Calame 2007; Baltimore et al. 2008). Die Expression der miR155 war in der vorliegenden Arbeit 8 h nach LPS-Stimulation in beiden Genotypen erhöht. Ähnlich wie bei Trib1 wäre somit zu diesem Zeitpunkt eine eher modulierende Rolle der miR155 auf die pro-inflammatorische Wirkung des NF-IL6 denkbar. 24 h nach LPS-Stimulation war die Expression der miR155 in den KO höher als in den WT, jedoch nur in 2 von 6 Proben, und könnte ein Zeichen erhöhter Inflammation in den KO darstellen. TNF α kann die Expression der miR155 induzieren (O'Connell et al. 2007). Tatsächlich war hier eine erhöhte TNF α -Expression in den KO zu diesem Zeitpunkt nachweisbar. Insgesamt ist auch für die miR155 eine Beteiligung an der dualen Rolle des NF-IL6 eher unwahrscheinlich. Nichtsdestotrotz sind weitere Studien zur genaueren Klärung der Funktionen der miR155 und auch im Hinblick auf eine potentielle Nutzung der miR155 zur Beeinflussung der NF-IL6-Aktivität von großem Interesse.

Eine weitere Möglichkeit den Funktionswechsel von NF-IL6 von pro- zu anti-inflammatorisch zu verursachen könnte ein Wechsel zwischen den Isoformen von NF-IL6 darstellen. Die aktivierende Isoform LAP könnte die pro-inflammatorische Wirkung von NF-IL6 vermitteln, die inhibitorische Isoform LIP die anti-inflammatorische. Eine solche Veränderung des LIP:LAP-Verhältnisses wurde z. B. bereits bei SIV-Infektionen beschrieben, wo IFN β eine Erhöhung des LIP verursacht

(Ravimohan et al. 2010). Auch IL-10 kann STAT3-abhängig die LIP-Expression induzieren (Tanaka et al. 2005). Eine verstärkte Expression von LAP hingegen kann z. B. durch Rapamycin verursacht werden (Smink und Leutz 2010). In der vorliegenden Arbeit konnte 8 h nach LPS-Stimulation mittels Western Blot eine erhöhte LAP-Expression im Hypothalamus der WT nachgewiesen werden. Dies spricht dafür, dass LAP tatsächlich die pro-inflammatorische Wirkung des NF-IL6 vermittelt. Die inhibitorische Isoform LIP hingegen konnte im Western Blot nicht nachgewiesen werden. In der Literatur wurde LIP bisher lediglich in Geweben wie Mamma (Dearth et al. 2001) oder Speicheldrüse (Reinhold und Ekstrom 2004) sowie in neuroglialer Zellkultur (Ejarque-Ortiz et al. 2007) nachgewiesen, jedoch nie in Gehirngewebe. Dies könnte eventuell durch eine geringe Stabilität des LIP verursacht sein. Auch proteolytische Prozesse während der Protein-Extraktion könnten hierfür verantwortlich sein. In einer früheren Studie wurde Proteolyse während der Protein-Extraktion auch als mögliche Ursache für das Vorkommen kleiner NF-IL6-Formen wie auch LIP propagiert (Baer und Johnson 2000). Durch Zugabe von Protease-Inhibitoren während der Protein-Extraktion wurden in der vorliegenden Arbeit proteolytische Prozesse zwar minimiert, können jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden. In einer gemischten neuroglialen Zellkultur wurde 8 h nach LPS-Stimulation eine erhöhte LAP-Expression, 24 h nach LPS-Stimulation jedoch eine erhöhte LIP-Expression beobachtet (Ejarque-Ortiz et al. 2007). LIP könnte also die späte, anti-inflammatorische Wirkung von NF-IL6 vermitteln, es war jedoch nicht möglich dies in der vorliegenden Arbeit eindeutig nachzuweisen.

1.5 Signifikanz dieser Ergebnisse

(Damm et al. 2011) postulierte, dass NF-IL6 an der Aufrechterhaltung oder an der Beendigung der Entzündungsreaktion beteiligt sein könnte. Die vorliegende Arbeit zeigte zum ersten Mal, dass NF-IL6 8 h nach LPS-Stimulation eine pro-inflammatorische Wirkung vermittelt und somit an der Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion maßgeblich beteiligt ist. 24 h nach LPS-Behandlung vermittelte NF-IL6 hingegen eine anti-inflammatorische Wirkung, so dass es auch an der Beendigung der Entzündungsreaktion beteiligt ist. Eine solche duale Rolle, die eine

aktive Beeinflussung der Entzündungsreaktion durch einen Transkriptionsfaktor ermöglicht, wurde bisher noch nicht beschrieben. NFκB-defiziente Mäuse z. B. zeigen lediglich eine starke Verminderung des LPS-induzierten Fiebers (Kozak et al. 2006), nicht jedoch eine solche komplexe Regulation der Entzündungsreaktion. Eine Beeinflussung der NF-IL6-Aktivität oder des LIP:LAP-Verhältnisses könnte also in Zukunft eine mögliche neue Therapie für Krankheiten darstellen, die mit einer verstärkten Neuroinflammation einhergehen wie z. B. die Alzheimer'sche Krankheit (Strohmeyer et al. 2014).

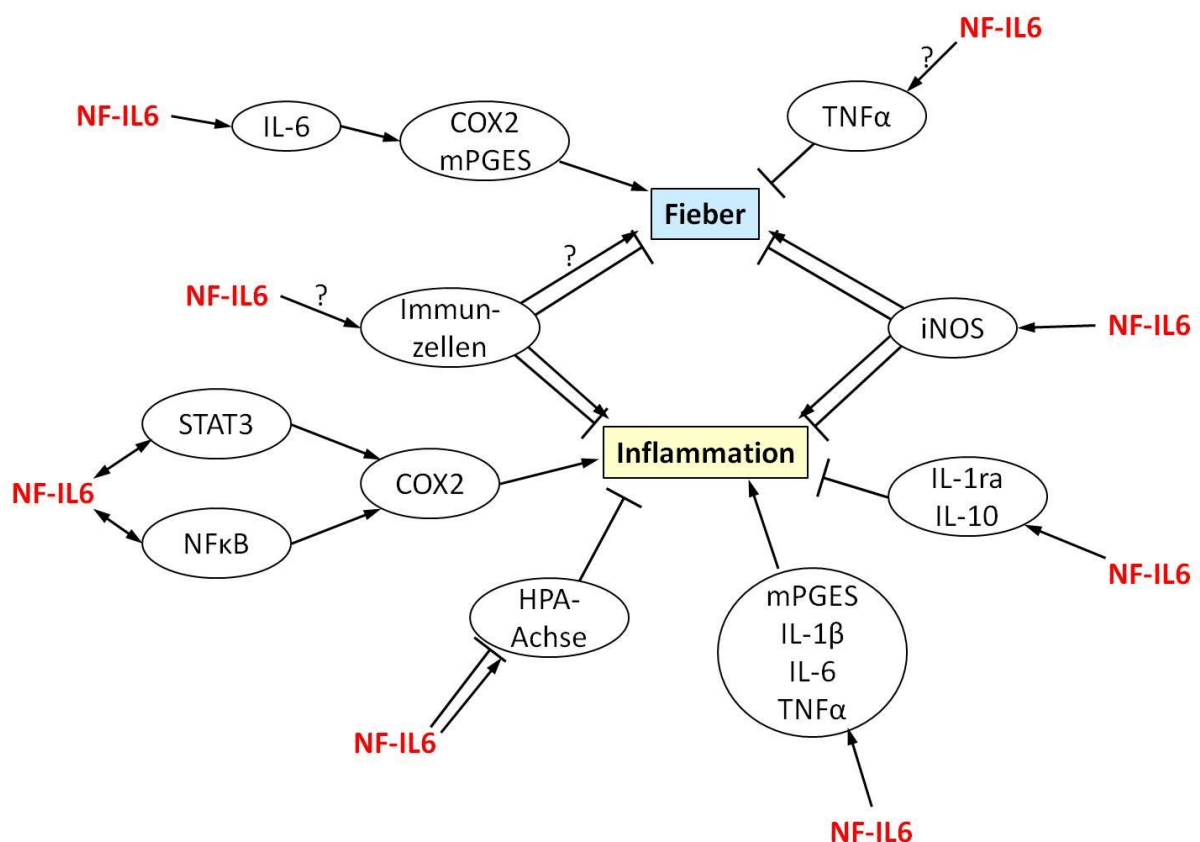


Abbildung IV-1

Beeinflussung der Inflammation und des Fiebers durch verschiedene potentiell NF-IL6-vermittelte Mechanismen. Die Entstehung von Fieber wird hauptsächlich über die mikrosomale Prostaglandin E Synthase (mPGES) und die Cyclooxygenase 2 (COX2) vermittelt. Deren Expression wird durch „signal transducer and activator of transcription“ (STAT)3 und „nuclear factor“ (NF)κB reguliert. Beide Transkriptionsfaktoren können mit NF-IL6 interagieren. NF-IL6 kann außerdem die Expression verschiedener inflammatorischer Zytokine regulieren. Peripher vorkommender Tumornekrosefaktor (TNF)α kann antipyretisch wirken. Zentrales TNFα, Interleukin (IL)-1β und IL-6 wirken zudem pro-inflammatorisch, während IL-

10, IL-1-Rezeptor-Antagonist (ra) und die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HPA) anti-inflammatorisch wirken. NF-IL6 beeinflusst dabei insbesondere die basale Aktivität der HPA-Achse. Immunzellen und die induzierbare „nitric oxide“ Synthase (iNOS) können sowohl fördernd als auch hemmend auf die Fieberantwort und die Inflammation wirken. Beide zeigten in dieser Arbeit eine Beeinflussung durch NF-IL6.

2. Einflüsse von NF-IL6 auf die Stress-Antwort

Einige Mediatoren des humoralen und des zellulären Kommunikationswegs zwischen Immunsystem und Gehirn können auch die HPA-Achse beeinflussen, so z. B. IL-1 β (Tsagarakis et al. 1989; Hsieh et al. 2010), IL-6 (Turnbull et al. 2003) und iNOS (Turnbull et al. 1998; Hsieh et al. 2010) sowie perivaskuläre Makrophagen (Serrats et al. 2010). Auch eine direkte Beteiligung von NF-IL6 an der HPA-Achse wurde bereits postuliert (Fuchs et al. 2013). Im Laufe dieser Arbeit wurden die Tiere sowohl einem psychologischen Stress (NES) als auch einem immunologischen Stress (LPS) ausgesetzt. Aufgrund der relativ geringen Anzahl verfügbarer Tiere wurden die Mäuse nur nach der LPS-Stimulation, nicht jedoch nach dem NES getötet und untersucht, so dass für den NES lediglich die Körpertemperatur- und Aktivitäts-Daten vorliegen

Beide Genotypen reagierten dabei auf den NES mit einer Erhöhung der Körpertemperatur, die etwa bis 2 h nach Beginn des NES andauerte. Die WT zeigten außerdem eine erhöhte Aktivität ebenfalls während der ersten 2 h nach Beginn des NES, was mit Erkundungsverhalten in der neuen Umgebung erklärt werden kann. Anschließend fiel die Aktivität der WT wieder auf basale Level ab. Die Aktivität der KO hingegen war über die gesamten 4 h der Aufzeichnung deutlich erhöht. Die Reaktion der Tiere auf Stressreize scheint also durch NF-IL6 beeinflusst zu werden.

2.1 Beeinflussung der Stress-Achse durch NF-IL6

Die Corticosteronspiegel im Blutplasma der WT zeigten einen normalen zirkadianen Rhythmus mit hohen Corticosteron-Spiegeln abends (8 h nach PBS-Behandlung) und niedrigen Corticosteron-Spiegeln morgens (24 h nach PBS-Behandlung). Die KO hingegen wiesen keine zirkadiane Rhythmik sondern vielmehr dauerhaft hohe Corticosteron-Spiegel auf. Dies war begleitet von erhöhter basaler POMC-Expression in den KO im Vergleich zu den WT. Die Regulation solcher zirkadianer Rhythmen

erfolgt im *nucleus suprachiasmaticus*. Dieser erhält, aufgrund seiner Lage direkt über der Sehnervenkreuzung, Informationen über Lichteinfall in die Augen. Anschließend kommt es dort zu einer Regulation der Expression verschiedener Gene, die über Glutamat, PACAP und VIP („vasoactive intestinal peptide“) gesteuert wird (Golombek und Rosenstein 2010). In dieser Arbeit war die Expression des PACAP in den KO im Vergleich zu den WT nicht verändert. Es konnte auch kein circadianer Rhythmus der PACAP-Expression festgestellt werden, wie er für den SCN bereits beschrieben wurde (Fukuhara et al. 1997). Dies könnte jedoch dadurch bedingt sein, dass hier die Expression im gesamten Hypothalamus und nicht nur im SCN untersucht wurde. Die Wirkung von PACAP und VIP wird über drei verschiedene Rezeptoren vermittelt: PAC1, VIPR1 und VIPR2. PAC1 wird dabei eine eher regulatorische Bedeutung für die innere Uhr zugeschrieben (Hannibal et al. 2001). VIPR2-defiziente Mäuse zeigen einen deutlich reduzierten Tag-Nacht-Rhythmus (Hannibal et al. 2011). Die Rolle des VIPR1 ist noch nicht abschließend geklärt, ihm wird jedoch eine ähnliche Funktion wie VIPR2 zugesprochen (Joo et al. 2004). Da lediglich für den VIPR1 eine NF-IL6-abhängige Regulation der Expression beschrieben ist (Sreedharan et al. 1995), wurde dieser in der vorliegenden Arbeit untersucht. Die KO zeigten dabei eine basal verminderte Expression des VIPR1, unter anderem im SCN. Dies ist eine mögliche Erklärung für den aufgehobenen zirkadianen Rhythmus der Corticosteron-Freisetzung. Es wird also zum ersten Mal die Hypothese einer Beteiligung von NF-IL6 an der Regulation der inneren Uhr vorgeschlagen (siehe auch Abbildung IV-2).

Außerdem ist auch eine Regulation der CRH-Freisetzung im Hypothalamus durch PACAP beschrieben, die jedoch Stressor-abhängig zum Tragen kommt. So reagieren PACAP-defiziente Mäuse auf einen psychologischen Stress mit einem deutlich geringeren Anstieg der Stresshormone im Blut als WT, während sich die Stresshormone nach LPS-Stimulation nicht von denen der WT unterscheiden. (Stroth et al. 2011; Lehmann et al. 2013). PACAP könnte also, auch wenn keine Unterschiede nach LPS-Stimulation gefunden wurden, dennoch an der veränderten Reaktion der KO auf den NES beteiligt sein.

Auch eine Beteiligung von PACAP an der Migration neutrophiler Granulozyten ist bereits bekannt: Die Gabe von PACAP reduzierte die LPS-induzierte Rekrutierung von NG. In PAC1-defizienten Mäusen hingegen zeigte PACAP keine Wirkung. (Martinez et al. 2005). Da PACAP in den KO jedoch nicht verändert war und diese Wirkung über den PAC1 vermittelt wird, der nicht NF-IL6-abhängig exprimiert wird, scheint NF-IL6 für diesen Mechanismus nicht von großer Bedeutung zu sein.

Zusätzlich ist auch beschrieben, dass NO die Freisetzung von CRH hemmt. So kann ein NO-Donor z. B. die IL-1 β -induzierte Erhöhung der CRH-Expression in einer Zellkultur des PVN hemmen (Costa et al. 1993; Riedel 2000). Die iNOS-Expression der KO war 8 h nach LPS-Stimulation im Vergleich zu den WT vermindert, es waren jedoch keine Veränderungen der POMC-Expression oder der Corticosteron-Spiegel zu beobachten. Die Beeinflussung der HPA-Achse durch NO konnte hier also nicht bestätigt werden (siehe auch Abbildung IV-2). Es ist jedoch möglich, dass an der Beeinflussung der HPA-Achse andere NOS-Isoformen beteiligt sind.

Des Weiteren können auch inflammatorische Zytokine die Aktivität der HPA-Achse beeinflussen. Als wichtigstes Zytokin gilt dabei IL-1 β . Intravenöse Applikation von IL-1 β verursacht in Ratten Dosis-abhängig einen Anstieg der ACTH- und Corticosteron-Freisetzung (Gwosdow et al. 1990). In den KO wurde basal kein Unterschied der IL-1 β -Expression im Vergleich zu den WT gefunden, so dass IL-1 β wahrscheinlich nicht an der Aufhebung des zirkadianen Rhythmus der Corticosteron-Freisetzung in den KO beteiligt ist. Auch IL-6 spielt eine wichtige Rolle in der Aktivierung der HPA-Achse. So können inflammatorische Stimuli in CRH-defizienten Mäusen eine Aktivierung der HPA-Achse auslösen, nicht jedoch in CRH- und IL-6-defizienten Mäusen (Bethin et al. 2000). Die erhöhten basalen IL-6-Plasmalevel in den KO im Vergleich zu den WT könnten also ebenfalls die basale Aktivität der HPA-Achse modulieren. Des Weiteren kann auch IL-10 die Expression von CRH und ACTH induzieren und so die HPA-Achse beeinflussen (Smith et al. 1999). IL-10 war in den KO jedoch basal nicht verändert, so dass es an den basalen Veränderungen der HPA-Achse in den KO wahrscheinlich nicht beteiligt ist. Dennoch könnten diese inflammatorischen Zytokine auch zur veränderten Stress-Antwort der KO nach dem

NES beigetragen haben (Abbildung IV-2). Um dies genauer zu klären sind jedoch weitere Studien nötig.

Schließlich können auch perivaskuläre Makrophagen die Stress-Achse beeinflussen. Depletion der perivaskulären Makrophagen führt zu einem deutlich verminderten IL-1 β -induzierten, jedoch zu einem erhöhten LPS-induzierten Anstieg der ACTH- und Corticosteron-Freisetzung (Serrats et al. 2010). Die KO zeigten basal im Vergleich zu den WT eine erhöhte Anzahl perivaskulärer Makrophagen im Gehirn. Diese Veränderung stellt also ebenfalls eine mögliche Erklärung für die basalen Veränderungen der HPA-Achse dar. Die genaue Rolle der Makrophagen für die HPA-Achsen-Aktivierung bleibt jedoch weiterhin unklar (Abbildung IV-2).

NF-IL6 scheint also an der Regulation der HPA-Achse beteiligt zu sein, wobei in den KO jedoch hauptsächlich basale Veränderungen gefunden wurden, nicht jedoch nach LPS-Stimulation. Veränderungen der HPA-Achse könnten demnach außerdem zur erhöhten Aktivität der KO nach dem NES beitragen. Dieser Zusammenhang sollte allerdings abschließend in weiteren Studien geklärt werden, da nach dem NES hier keine Tiere zur Untersuchung zur Verfügung standen.

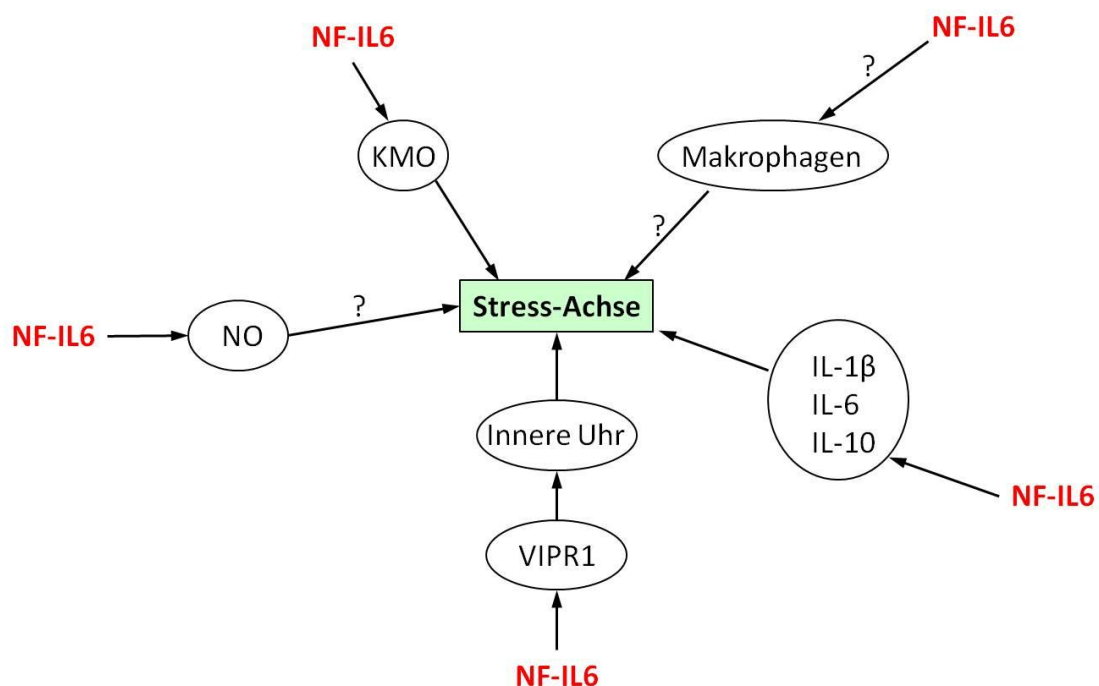


Abbildung IV-2

Verschiedene Mechanismen zur Beeinflussung der Stress-Achse, die durch NF-IL6 moduliert werden könnten. Es ist beschrieben, dass Stickoxid (NO) die Freisetzung von „corticotropin releasing hormone“ (CRH) und damit die Stress-Achse hemmen kann. Dieser Mechanismus konnte hier jedoch nicht nachgewiesen werden. Auch Beeinflussung durch perivaskuläre Makrophagen wird diskutiert. Interleukin (IL)-1 β , IL-6 und IL-10 können ebenfalls zur Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren (HPA)-Achse beitragen. Auch die Kynurenin-Monooxygenase (KMO) kann die HPA-Achse regulieren (siehe Kapitel III.3). Zusätzlich steuert die innere Uhr unter Beteiligung des VIP-Rezeptor 1 (VIPR1) z. B. die zirkadiane Rhythmik der Corticosteron-Ausschüttung.

3. Einfluss von NF-IL6 auf die basale lokomotorische Aktivität

Die KO zeigten interessanterweise basal drastisch reduzierte Aktivität im Vergleich zu den WT. Dabei wiesen die KO keine Anzeichen für Schmerzen oder andere Beeinträchtigungen auf. Auf den NES reagierten sie sogar mit erhöhter Aktivität. Die KO waren also nicht generell in ihrer lokomotorischen Aktivität beeinträchtigt.

In KO war insbesondere die nächtliche Aktivität reduziert und somit der zirkadiane Rhythmus der Aktivität aufgehoben. Damit könnte auch hier die verminderte VIPR1-Expression eine Rolle spielen. In der Tat zeigen VIPR2-defiziente Mäuse deutlich reduzierte motorische Aktivität (Harmar et al. 2002). Aufgrund der propagierten ähnlichen Funktion von VIPR1 und 2 (Joo et al. 2004) ist eine Beteiligung des reduzierten VIPR1 in KO im Vergleich zu WT an der geringeren basalen Aktivität der KO also durchaus wahrscheinlich (siehe auch Abbildung IV-3). Auch die erhöhten basalen Corticosteron-Spiegel der KO könnten einen Einfluss auf die geringere basale Aktivität haben. So können chronische Corticosteron-Gaben z. B. depressives Verhalten auslösen, welches mit reduzierter Aktivität einhergeht (van Donkelaar et al. 2014) (siehe auch Abbildung IV-3).

Es ist zudem bereits beschrieben, dass über den Dopamin-D₂-Rezeptor ebenfalls eine Verminderung der lokomotorischen Aktivität erreicht werden kann (Boulay et al. 1999; Boulay et al. 1999). Da für diesen jedoch bisher keine NF-IL6-Bindungsstelle am Promotor beschrieben wurde, wurde dieser in der vorliegenden Arbeit nicht

untersucht. Es ist natürlich dennoch möglich, dass Dopamin an der verminderten Aktivität der KO beteiligt ist.

Auch für Metabolite des Tryptophan ist bekannt, dass sie die lokomotorische Aktivität beeinflussen können (Abbildung IV-3). Zusätzlich wurde vor Kurzem beschrieben, dass Mäuse, denen ein Enzym des Tryptophan-Metabolismus – die KMO – fehlt, erhöhte Amphetamin-induzierte Aktivität aufwiesen (OConnor 2014). Dies könnte mit der erhöhten Aktivität der KO nach dem NES zusammen hängen (siehe auch Abbildung IV-2).

3.1 Beeinflussung des Tryptophan-Metabolismus durch NF-IL6

Die KO zeigten im Vergleich zu den WT 8 h nach LPS-Stimulation geringere IDO- und höhere TPH2-Expression. 24 h nach LPS-Behandlung war zudem die KMO-Expression erhöht. Auch der Serotonin-Wiederaufnahmetransporter Slc6A4 war nach allen Behandlungen in den KO erhöht. In der Leber hingegen zeigten die KO höhere IDO- und geringere KMO-Expression nach LPS-Stimulation.

In der Leber findet dabei hauptsächlich der basale Tryptophan-Metabolismus statt, während er bei Inflammation eher extrahepatisch abläuft (Myint 2012). Die erhöhte hepatische IDO-Expression in den KO 8 h nach LPS-Stimulation ist also für das Entzündungsgeschehen wahrscheinlich eher von untergeordneter Bedeutung. Die KO wiesen außerdem basal geringgradig verminderte hepatische KMO-Expression auf. Dies könnte also tatsächlich wie oben erwähnt zu der erhöhten Stress-induzierten Aktivität der KO beitragen (OConnor 2014).

Im Hypothalamus hingegen wiesen die KO im Vergleich zu den WT 8 h nach LPS-Behandlung verminderte Expression der IDO, die ein limitierendes Enzym für den Kynurenin-Syntheseweg ist, jedoch erhöhte Expression der TPH2 auf, die für die Serotonin-Synthese verantwortlich ist. Die KO zeigten also im Vergleich zu den LPS-behandelten WT eine Verschiebung weg von der Kynurenin- und hin zur Serotonin-Synthese (Abbildung IV-4). Die KO könnten somit vor LPS-induziertem depressiven Verhalten geschützt sein.

Die Regulation der Expression der Enzyme des Tryptophan-Metabolismus ist bisher noch nicht vollständig geklärt. Bei der IDO-Expression wurde bereits eine Beteiligung von STAT3 (Robinson et al. 2005) und NF κ B (Fujigaki et al. 2006) beschrieben. Auch eine Rolle für TNF α (Robinson et al. 2005) und IL-6 (Kim et al. 2012) wurden bereits propagiert. Eine Beteiligung von NF-IL6 an der IDO-Expression wurde bisher jedoch noch nicht nachgewiesen. Dabei ist entweder eine direkte Bindung von NF-IL6 an den IDO-Promotor möglich (Robinson et al. 2005) oder eine indirekte Induktion über IL-6.

Für die TPH2-Expression wurde bereits eine zirkadiane Rhythmik beschrieben (Malek et al. 2005), was in dieser Arbeit nicht bestätigt werden konnte. Zudem wurde eine Regulation der TPH2-Expression bei fettreicher Ernährung (Hageman et al. 2010) und unter Stress (Heydendaal und Jacobson 2009; Chen und Miller 2012) beobachtet. Der fehlende zirkadiane Rhythmus der Corticosteron-Freisetzung der KO könnte also ein Grund für die fehlende zirkadiane Rhythmik der TPH2-Expression sein.

Des Weiteren war die basale Expression des Serotonin-Wiederaufnahme-Transporters Slc6A4 in den KO erhöht. Es wurde bereits gezeigt, dass NF-IL6 die LPS-induzierte Slc6A4-Expression in Makrophagen hemmen kann (Zimmermann et al. 2014). Auch eine Beteiligung von IL-6 an der Slc6A4-Expression wurde bereits beschrieben. So sind die Slc6A4-Expression und -Proteinlevel in IL-6-defizienten Mäusen erhöht, während Gabe von IL-6 die Slc6A4-Expression und Proteinlevel vermindert (Kong et al. 2015). Die erhöhte basale Slc6A4-Expression in den KO beweist also die hemmende Wirkung des NF-IL6 auf die Slc6A4-Expression auch im Hypothalamus. Dies könnte sowohl direkt über Wirkung des NF-IL6 am Slc6A4-Promotor als auch indirekt über die erhöhten basalen IL-6-Level der KO vermittelt sein. Hemmung des Slc6A4 ist eine gängige Methode zur Therapie von Depressionen (Saletu et al. 1977). Veränderte Slc6A4-Expression durch einen Polymorphismus des Promotors kann außerdem Depressionen fördern (Jonassen und Landro 2014). Die erhöhte basale Slc6A4-Expression der KO könnte also depressives Verhalten in den KO begünstigen und somit die reduzierte basale Aktivität der Tiere verursachen. Es ist jedoch auch möglich, dass durch den angeborenen Mangel des NF-IL6 und den damit verbundenen

Veränderungen des Tryptophan-Metabolismus die Gehirnentwicklung und das gesamte Serotonin-System gestört sind (Sibille und Lewis 2006).

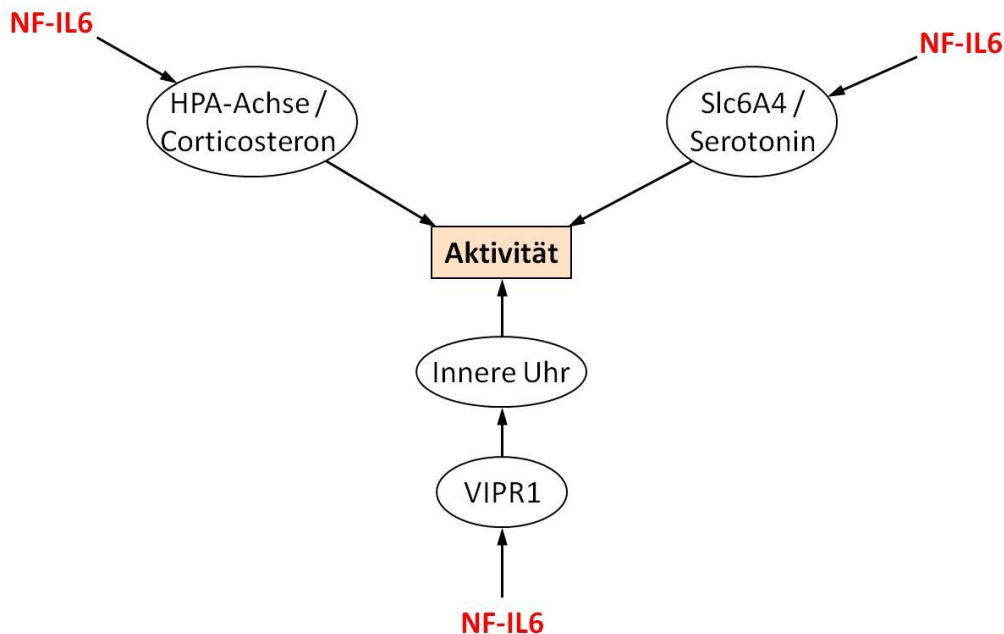


Abbildung IV-3

Mögliche Mechanismen der Beeinflussung der lokomotorischen Aktivität moduliert durch NF-IL6. Die Aktivität der Mäuse könnte durch die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren (HPA)-Achse und insbesondere durch Corticosteron beeinflusst werden. Auch eine Regulation durch Serotonin und dessen Wiederaufnahme in die Synapsen durch den Transporter Slc6A4 ist möglich. Zusätzlich kann auch die innere Uhr unter Beteiligung des VIP-Rezeptor 1 die Aktivität beeinflussen.

Insgesamt wurde in dieser Arbeit also zum ersten Mal eine mögliche Beteiligung von NF-IL6 an der Expression der IDO, der TPH2 und des Slc6A4 und damit an der Entstehung LPS-induzierter depressionsartiger Verhaltensweisen bzw. „sickness behavior“ nachgewiesen. Der Tryptophan-Metabolismus ist jedoch nicht nur an der Entstehung von Depressionen beteiligt, ihm wird auch eine Rolle bei der Entstehung verschiedener anderer Krankheiten wie Parkinson (Ogawa et al. 1992) oder Alzheimer (Schwarz et al. 2013) zugeschrieben. Kürzlich wurde zudem nachgewiesen, dass einige Kynurenin-Metabolite z. B. bei chronischer Inflammation oder bei Depressionen die Struktur des Hippocampus und der Amygdala verändern können (Savitz et al. 2015). Mechanismen um den Tryptophan-Metabolismus zu modulieren

sind also von großem Interesse. Da NF-IL6, wie in Kapitel I.3.4.1 beschrieben, durch verschiedene Stoffe beeinflusst werden kann, könnte eine Modulation der NF-IL6-Aktivität in Zukunft ein mögliches therapeutisches Ziel zur Behandlung von Depressionen oder evt. sogar Alzheimer und Parkinson darstellen.

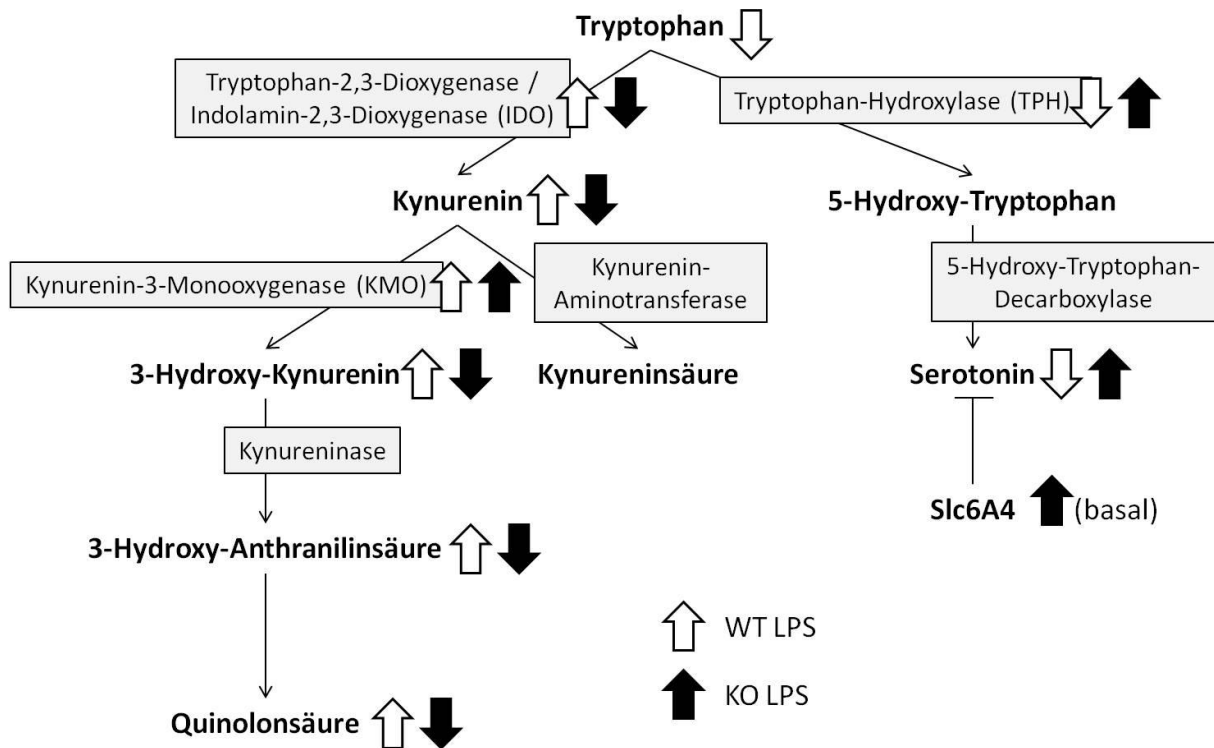


Abbildung IV-4

Veränderungen des Tryptophan-Metabolismus in den KO nach LPS-Behandlung. Die WT zeigten nach LPS-Behandlung (weiße Pfeile) erhöhte Expression der Enzyme des Kynurenin-Pfades. Die KO hingegen (schwarze Pfeile) zeigten nach LPS-Stimulation im Vergleich dazu verminderte Expression der Indoamin-2,3-Dioxygenase, die die Kynurenin-Synthese vermittelt, und verstärkte Expression der Tryptophan-Hydroxylase, die geschwindigkeitsbestimmend für die Serotonin-Synthese ist. Die KO scheinen damit vor LPS-induzierter Depression geschützt zu sein. Zusätzlich zeigten die KO erhöhte basale Expression des Serotonin-Wiederaufnahmetransporters Slc6A4, was eine mögliche Erklärung für die verminderte basale Aktivität der KO sein könnte.

4. Fazit und Ausblick

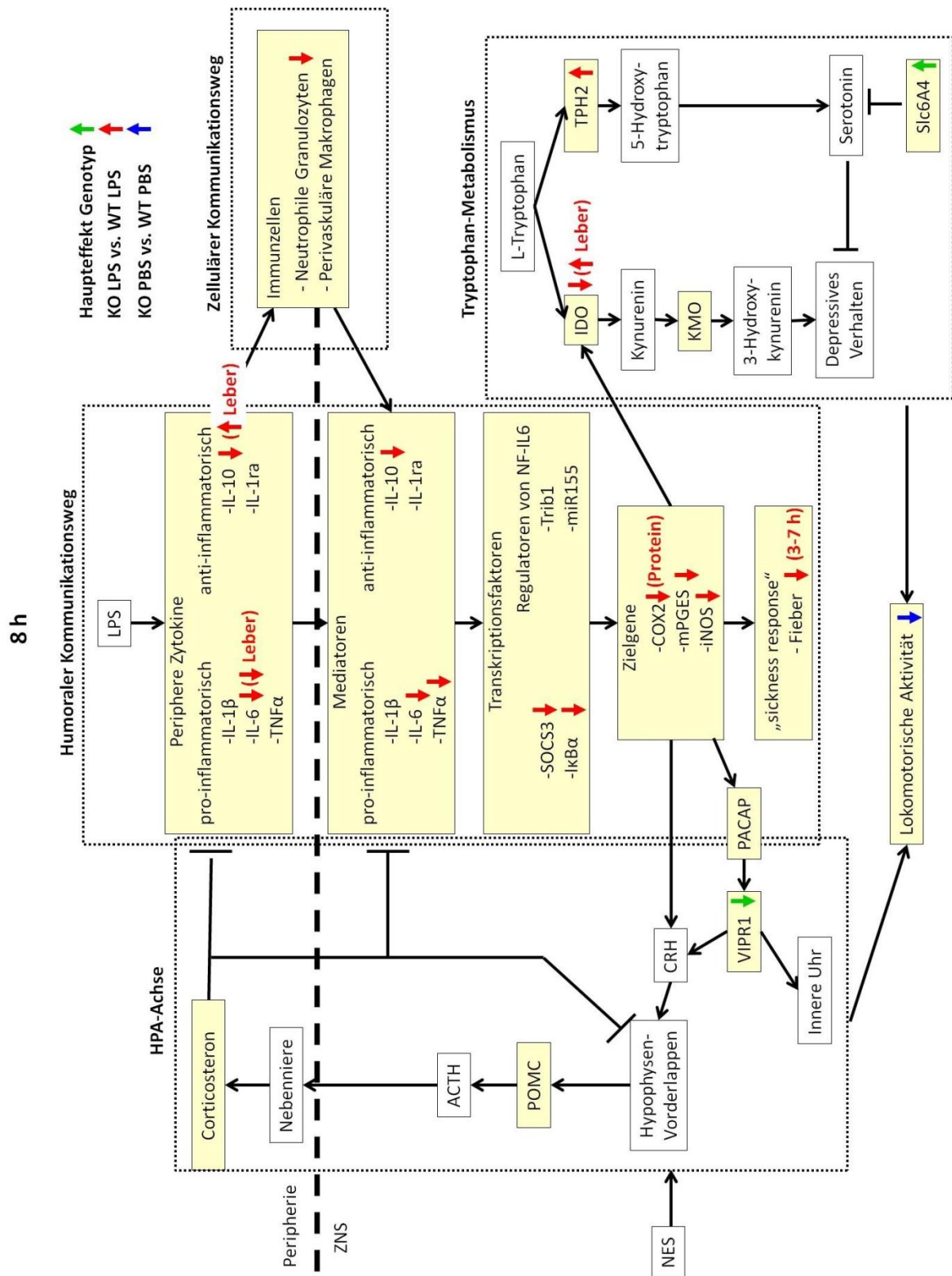


Abbildung IV-5

Übersicht über die verschiedenen Kommunikationswege zwischen Immunsystem und Gehirn und ihre Veränderungen in den KO 8 h nach LPS-Stimulation im Vergleich zu den WT.

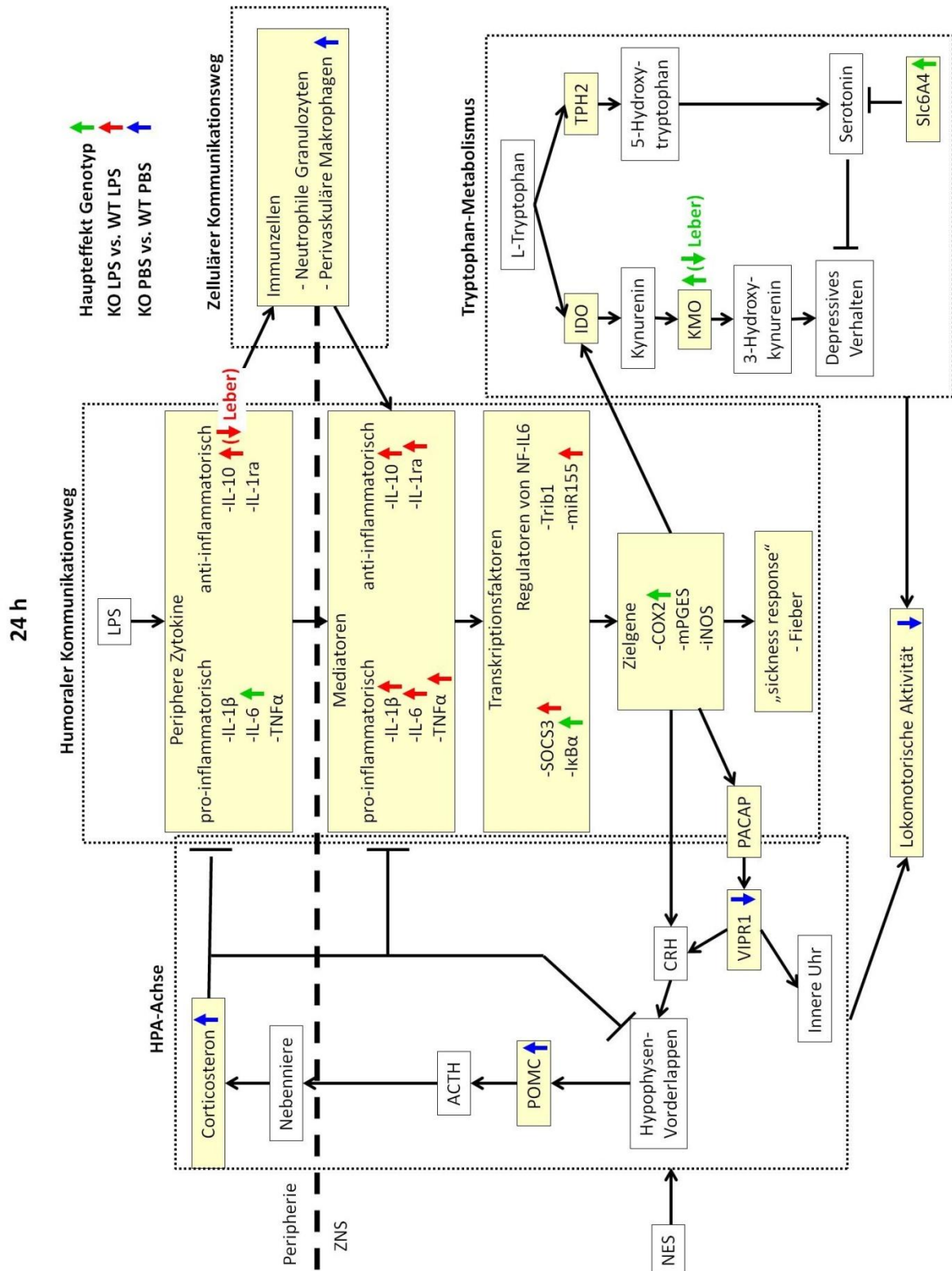


Abbildung IV-6

Übersicht über die verschiedenen Kommunikationswege zwischen Immunsystem und Gehirn und ihre Veränderungen in den KO 24 h nach LPS-Stimulation im Vergleich zu den WT.

Die Abbildung IV-5 und die Abbildung IV-6 zeigen eine Übersicht über die in den KO gefundenen Veränderungen der verschiedenen Kommunikationswege zwischen dem Immunsystem und dem Gehirn sowie ihre Zusammenhänge.

Die KO waren in der Lage eine normale Fieberreaktion als Antwort auf die niedrige LPS-Dosis zu entwickeln. Nach der hohen LPS-Dosis hingegen, war die Fieberantwort der KO 3 – 7 h nach der Injektion nahezu aufgehoben. Die IL-6-Plasmalevel der KO waren 8 h nach LPS-Injektion in den KO deutlich niedriger als in den WT. Da IL-6 bekanntermaßen die COX2 und die mPGES induzieren kann (Rummel et al. 2006; Rummel et al. 2011; Eskilsson et al. 2014), könnte dies einen der zugrunde liegenden Mechanismen der reduzierten Fieberantwort darstellen. Auch die erhöhte periphere TNF α -Expression könnte zu dieser Antwort beitragen, da peripherem TNF α antipyretische Wirkungen zugesprochen werden (Klir et al. 1995; Kozak et al. 1995). Zusätzlich wurde diese Antwort in den KO durch im Vergleich zu den WT geringere hypothalamische Expression weiterer inflammatorischer Mediatoren - z. B. SOCS3, I κ B α , TNF α und IL-10 – sowie durch reduzierte Rekrutierung neutrophiler Granulozyten zum Gehirn der KO begleitet. 8 h nach Injektion der hohen LPS-Dosis war die Entzündungsreaktion in den KO also deutlich geringer als in den WT. 24 h nach LPS-Stimulation hingegen war die Fieberreaktion der KO unverändert, während die hypothalamische Expression inflammatorischer Mediatoren ebenso wie die IL-6- und IL-10-Plasmalevel gegenüber den WT erhöht waren.

Zudem war in den KO 8 h nach LPS-Stimulation die hypothalamische Expression derIDO niedriger als in den WT, während die Expression der TPH2 erhöht war. Dies spricht für eine Verschiebung des Tryptophan-Metabolismus zu – verglichen mit den WT – verminderter Kynurenin- jedoch vermehrter Serotonin-Synthese. Die KO scheinen dadurch vor LPS-induzierten Depressionen geschützt zu sein.

Des Weiteren war die basale Aktivität der KO im Vergleich zu den WT drastisch reduziert. Dies könnte durch vermehrte basale Expression des Serotonin-Wiederaufnahmetransporters Slc6A4 und dadurch vermitteltes depressionsartiges Verhalten vermittelt sein. Auch war die basale Aktivität der HPA-Achse in den KO

beeinflusst. Die zirkadiane Rhythmik der Corticosteron-Freisetzung war in den KO aufgehoben und die Corticosteron-Plasmalevel dauerhaft auf hohem Niveau. Ursache dafür könnte eine Beeinflussung der inneren Uhr durch NF-IL6 sein. Beides könnte außerdem zur reduzierten basalen Aktivität der KO beitragen.

Folgende neue Hypothesen konnten aus diesen Ergebnissen in der vorliegenden Arbeit entwickelt werden:

4.1 NF-IL6 ist an der Aufrechterhaltung und an der Beendigung der Fieberantwort und der Entzündungsreaktion beteiligt

Die KO zeigten 8 h nach LPS-Behandlung reduzierte, 24 h nach LPS-Stimulation hingegen erhöhte Inflammation. NF-IL6 wirkt also erst pro-, später anti-inflammatorisch. Somit konnte die frühere Hypothese, dass NF-IL6 an der Aufrechterhaltung oder der Beendigung der Entzündungsreaktion beteiligt sein könnte (Damm et al. 2011), bestätigt werden: NF-IL6 ist sowohl an der Aufrechterhaltung als auch an der Beendigung der Entzündungsreaktion beteiligt. Damit wurde zum ersten Mal eine aktive Beeinflussung des Entzündungsgeschehens durch einen Transkriptionsfaktor beschrieben. Eine ähnliche Funktion wurde bisher nur den sogenannten „small proresolving mediators“ zugeschrieben (Serhan et al. 2014).

4.1.1 Die duale Rolle von NF-IL6 wird durch einen Wechsel zwischen den beiden Isoformen von NF-IL6 vermittelt

Die pro-inflammatorische Wirkung von NF-IL6 könnte durch die aktivierende Isoform LAP, die anti-inflammatorische Wirkung durch die inhibitorische Isoform LIP vermittelt werden. Diese Hypothese konnte in der vorliegenden Arbeit nicht endgültig bestätigt werden. Hier sind somit weitere Studien z. B. an LIP-überexprimierenden Mäusen, wie z. B. von (Zahnow et al. 2001) beschrieben, nötig. Eine weitere Erforschung dieses Themas ist jedoch sehr vielversprechend, da das LIP:LAP-Verhältnis durch verschiedene Mediatoren, wie z. B. IFN β , beeinflusst werden kann, es wäre also in Zukunft eine therapeutische Nutzung denkbar. Dies könnte insbesondere für Krankheiten relevant sein, die mit einer stark erhöhten Inflammation einhergehen wie z. B. Sepsis, amyotroper Lateralsklerose oder Alzheimer.

4.2 NF-IL6 beeinflusst die Rekrutierung von Immunzellen zum Gehirn

Die Rekrutierung von Immunzellen zum Gehirn ist sehr komplex reguliert. Hier wurde zum ersten Mal eine zeitabhängige Beteiligung von NF-IL6 an der Rekrutierung von NG und perivaskulären Makrophagen gezeigt. Über den zellulären Kommunikationsweg zum Gehirn ist bisher erst relativ wenig bekannt. Erst seit einigen Jahren (Dantzer et al. 2008) ist er zunehmend Gegenstand der aktuellen Forschung. So konnte z. B. gezeigt werden, dass NG an Verhaltensänderungen nach septischen LPS-Dosen beteiligt sind (Aguilar-Valles et al. 2014). Eine Beteiligung von NG an kognitiven Beeinträchtigungen, die oft als Spätfolgen bei Sepsis-Patienten auftreten, wäre also denkbar. Auch eine Beteiligung von NG an der Pathogenese von Meningitis wurde bereits beschrieben (Ribes et al. 2013).

Zudem wurde auch bereits gezeigt, dass Leptin, ein Hormon, das im weißen Fettgewebe produziert wird und somit bei Übergewicht erhöht ist, zur Rekrutierung von NG in das Gehirn bei schweren systemischen Entzündungsreaktionen beiträgt (Rummel et al. 2010; Aguilar-Valles et al. 2014; Aguilar-Valles et al. 2015). Auch eine Beteiligung von NF-IL6 an der Leptin-Expression scheint relevant zu sein. Die KO zeigen z. B. reduzierte Leptin-Spiegel (Wang et al. 2000). In einer Gesellschaft, in der Übergewicht immer größere Anteile der Bevölkerung betrifft, ist eine genauere Erforschung der Rolle von NG für inflammatorische Prozesse also von großem Interesse.

Rekrutierte NG könnten jedoch für das Gehirn auch eine anti-inflammatorische Rolle spielen. Während für leukopene Tiere eine verlängerte Fieberreaktion beschrieben ist (Tavares et al. 2006) konnte hier gezeigt werden, dass neutropene Tiere keinen LPS-induzierten Anstieg der IL-10-Expression aufweisen. Zusammen mit der reduzierten hypothalamischen NF-IL6-Immunreaktivität in den neutropenen Tieren spricht dies dafür, dass NG im Gehirn über NF-IL6 an der Produktion des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 beteiligt sein könnten. Auch die vermehrte corticale Expression von NF-IL6 und IL-6 spricht für eine anti-inflammatorische Rolle der NG. Diese Erkenntnis sollte auf jeden Fall in weiteren Studien verfolgt werden, da bei Chemotherapie-Patienten sehr häufig eine Neutropenie auftritt und einige der damit

zusammen hängenden Nebenwirkungen auf diese anti-inflammatorischen Wirkungen der NG zurückzuführen sein könnten.

4.3 Die basale Aktivität der HPA-Achse wird durch NF-IL6 beeinflusst

Nachdem zuvor propagiert wurde, dass NF-IL6 an der HPA-Achse beteiligt sein könnte (Fuchs et al. 2013), konnte in dieser Arbeit nun eindeutig gezeigt werden, dass insbesondere die basale Aktivität der HPA-Achse durch NF-IL6 reguliert zu sein scheint. Da die KO auch eine gegenüber den WT veränderte Antwort auf den NES zeigten, ist jedoch auch eine Beeinflussung der Stressantwort durch NF-IL6 denkbar. Da in dieser Arbeit jedoch keine Tiere zur Untersuchung unmittelbar nach dem NES zur Verfügung standen, sind hier weitere Studien nötig um die Beeinflussung der Stressantwort durch NF-IL6 abschließend zu klären. Stress-bedingte Erkrankungen sind in der heutigen Zeit ein großes Problem. In diesem Zusammenhang ist auch das Zusammenspiel von Stress mit dem Tryptophan-Metabolismus und depressiven Störungen hervorzuheben. Neue Einblicke in die Regulation der Stress-Achse könnten sich bei der Erforschung und Therapie dieser Krankheiten als nützlich erweisen.

4.4 NF-IL6 beeinflusst die innere Uhr

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal eine Beeinflussung der inneren Uhr durch NF-IL6 beschrieben. In den KO ging dies mit einer reduzierten nächtlichen Aktivität und einem aufgehobenem Tag-Nacht-Rhythmus der Corticosteron-Ausschüttung einher. Dies ist höchstwahrscheinlich durch Beeinflussung der Expression des VIPR1 insbesondere im SCN bedingt. Eine Beteiligung weiterer PACAP-Rezeptoren oder auch anderer Mechanismen ist jedoch nicht ausgeschlossen.

4.5 NF-IL6 ist an der Entstehung LPS-induzierter Depressionen beteiligt

Zum ersten Mal konnte in dieser Arbeit eine Beteiligung von NF-IL6 an der Entstehung LPS-induzierter depressionsartiger Verhaltensweisen bzw. „sickness behavior“ gezeigt werden. Sowohl die Expression derIDO als auch der TPH2 werden durch NF-IL6 beeinflusst. Die KO scheinen somit vor LPS-induzierten Depressionen geschützt zu sein. Eine Beeinflussung der NF-IL6-Aktivität könnte also ein potientes therapeutisches Ziel zur Behandlung von Depressionen darstellen.

Depressionen sind bereits die häufigste psychische Erkrankung in Deutschland. Fettige Nahrung und Übergewicht tragen ebenfalls zur Entstehung LPS-induzierter Depressionen bei (Andre et al. 2014), so dass Dank des zunehmenden Anteils übergewichtiger Personen auch weiterhin mit einem Anstieg der Inzidenz depressiver Störungen zu rechnen ist. Auch wird ein Zusammenhang mit anderen Erkrankungen wie Parkinson oder Alzheimer diskutiert (Ogawa et al. 1992; Schwarz et al. 2013). Diese Erkenntnisse könnten in Zukunft also von großem klinischen Nutzen sein.

V. Zusammenfassung

Systemische Entzündungen, experimentell ausgelöst durch Lipopolysaccharid (LPS), einem Bestandteil der Zellwände gram-negativer Bakterien, lösen Symptome wie Fieber, Anorexie, Lethargie und Depressionen aus. Dieser zentralnervös kontrollierte Symptomkomplex wird „sickness response“ genannt. Für die Kommunikation zwischen Immunsystem und Gehirn sind drei verschiedene Wege bekannt: Ein humoraler (I), ein zellulärer (II) und ein nervaler (III) Weg. (I) Bei systemischen Entzündungen werden peripher Zytokine freigesetzt, z. B. Interleukin(IL)-1 β , IL-6 und Tumornekrosefaktor (TNF) α . Diese aktivieren die Zellen der Blut-Hirn-Schranke oder gelangen über circumventrikuläre Organe – Gehirnstrukturen mit unvollständiger Blut-Hirn-Schranke – ins Gehirn. Dort aktivieren sie direkt oder indirekt über sekundäre Mediatoren hypothalamische Kerngebiete. Dabei regulieren Transkriptionsfaktoren die Expression inflammatorischer Zielgene, wodurch die „sickness response“ ausgelöst wird. (II) Auch Immunzellen können durch die peripheren Zytokine oder z. B. LPS aktiviert werden und anschließend ins Gehirn einwandern. Mittels lokaler Produktion inflammatorischer Zytokine können sie dort zur Aktivierung hypothalamischer Kerngebiete und zur Induktion der „sickness response“ beitragen. (III) Zusätzlich können Signale aus der Peripherie auch über sensorische und vagale Afferenzen zum Gehirn weitergeleitet werden. Als negativer Feedback-Mechanismus dient die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HPA-Achse), die durch die Produktion von Corticosteron anti-inflammatorisch wirkt. Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle des Transkriptionsfaktors NF-IL6 für die „sickness response“ und diese Kommunikationswege zwischen Immunsystem und Gehirn zu analysieren.

Dazu wurden NF-IL6-defiziente (KO) und Wildtyp-Mäuse (WT) einer neuen Umgebung ausgesetzt (Käfigwechsel) und die resultierende Stress-Antwort über 4 h aufgezeichnet. Des Weiteren wurde in den Tieren eine systemische Entzündung durch Injektion einer niedrigen (50 μ g/kg) oder einer hohen LPS-Dosis (2,5 mg/kg) ausgelöst. Kontrolltiere erhielten sterile „phosphate-buffered saline“ (PBS). Die „sickness response“ wurde mit Hilfe eines telemetrischen Systems aufgezeichnet. 8

oder 24 h nach Injektion der hohen LPS-Dosis bzw. PBS wurden die Tiere perfundiert, Gehirne, Blutproben und die Leber entnommen und mittels qRT-PCR, Immunfluoreszenz, ELISA, Zytokin-Bioassays und Western Blot analysiert.

Nach der niedrigen LPS-Dosis war die Fieberantwort der KO im Vergleich zu den WT tendenziell verlängert, 3 bis 7 h nach der hohen LPS-Dosis zeigten die KO jedoch eine deutlich verminderte Fieberreaktion. Diese war begleitet von einer reduzierten Inflammation 8 h nach LPS-Stimulation, was sich in, im Vergleich zu den WT, reduzierten IL-6- und IL-10-Plasmaspiegeln, reduzierter hypothalamischer Expression verschiedener inflammatorischer Mediatoren wie IL-6, IL-10, $\text{TNF}\alpha$, „suppressor of cytokine signaling“ (SOCS)3 und „inhibitor of $\text{NF}\kappa\text{B}$ “ ($\text{I}\kappa\text{B}$) α sowie verminderter Rekrutierung neutrophiler Granulozyten (NG) zum Gehirn äußerte. Die Expression der mikrosomalen Prostaglandin E Synthase und die Immunreaktivität der Cyclooxygenase 2 waren ebenfalls vermindert. Da Prostaglandin (PG)E2 einer der wichtigsten terminalen Mediatoren der Fieberentstehung darstellt, könnte diese Verringerung der geschwindigkeitsbestimmenden Enzyme der PGE2 Synthese eine Erklärung für das reduzierte Fieber der KO darstellen. 24 h nach LPS-Stimulation zeigten die KO hingegen verstärkte Inflammation sowie vermehrte Expression der inflammatorischen Mediatoren. Es konnte hier also zum ersten Mal gezeigt werden, dass NF-IL6 eine duale Rolle während des Entzündungsgeschehens spielt: Erst pro-, später anti-inflammatorisch. Dies könnte durch einen Wechsel zwischen der aktivierenden (LAP) und der inhibitorischen (LIP) NF-IL6-Isoform bedingt sein. Hier war allerdings nur LPS-induziertes LAP zum 8 h Zeitpunkt im Hypothalamus erhöht; LIP war nicht nachweisbar und sollte in weiterführenden Studien genauer untersucht werden. Auch die Inhibitoren des NF-IL6 micro RNA (miR)155 und Tribbles (Trib)1 wurden untersucht. Es waren jedoch keine Hinweise auf eine Beteiligung an der Regulation der NF-IL6-Aktivität feststellbar. Zur abschließenden Klärung könnten jedoch auch hier noch weitere Untersuchungen z. B. für Trib1 auf Proteinebene durchgeführt werden.

Des Weiteren war die Stress-induzierte Aktivität der KO gegenüber den WT erhöht, was auf eine Beteiligung von NF-IL6 an der HPA-Achse hindeuten könnte.

Tatsächlich wiesen die KO basal erhöhte morgendliche Corticosteron-Spiegel sowie erhöhte Proopiomelanocortin-Expression auf. Da zusätzlich die Expression des „pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide“ (PACAP)-Rezeptors VIPR1, der eine Rolle in der Regulation zirkadianer Rhythmen spielt, in den KO im Vergleich zu WT vermindert war, sind möglicherweise die beobachteten Veränderungen der HPA-Achse auch auf eine Beeinflussung der inneren Uhr durch NF-IL6 zurückzuführen.

Außerdem war in KO die basale Aktivität dramatisch vermindert, was ebenfalls durch die Beeinflussung der inneren Uhr und die erhöhten Corticosteron-Spiegel bedingt sein könnte. Zusätzlich zeigten die KO jedoch auch erhöhte basale Expression des Serotonin-Wiederaufnahmetransporters Slc6A4. Erhöhte Slc6A4-Expression, z. B. durch einen Polymorphismus des Promotors, kann beim Menschen depressives Verhalten auslösen. Die vermehrte Slc6A4-Expression der KO könnte also depressives Verhalten und damit auch eine verminderte Aktivität bedingen. Erstmalig konnte zudem nachgewiesen werden, dass KO nach LPS-Stimulation im Vergleich zu WT verminderte Expression der Indolamin-2,3-dioxygenase sowie erhöhte Tryptophan-Hydroxylase-Expression und damit eine verminderte Kynurenin- aber eine erhöhte Serotonin-Synthese aufweisen. Kynurenin kann depressives Verhalten induzieren, während Serotonin diesem entgegen wirkt. Die KO scheinen also vor LPS-induzierten Depressionen geschützt zu sein. Eine Beeinflussung der NF-IL6-Aktivität könnte also neben der Kontrolle von Inflammation ein potentielles therapeutisches Ziel für die Behandlung von Depressionen oder anderen im Zusammenhang stehenden Erkrankungen darstellen.

Um den zellulären Kommunikationsweg zum Gehirn genauer zu analysieren, wurde außerdem eine Studie an neutropenen und immunkompetenten Mäusen nach Stimulation mit 2,5 mg/kg LPS oder PBS durchgeführt. Die neutropenen Tiere wiesen dabei nach LPS-Stimulation verminderte Expression des für die NG-Migration wichtigen Chemokins CXCL1 auf. NG wirken also über Produktion von CXCL1 verstärkend auf ihre eigene Rekrutierung. Des Weiteren zeigten die neutropenen Tiere keinen LPS-induzierten Anstieg der IL-10-Expression und verminderte NF-IL6-Immunreaktivität. Hier fanden sich also zum ersten Mal Hinweise für eine anti-

inflammatorische Wirkung der NG über NF-IL6-induzierte IL-10-Expression. Da Neutropenie häufig im Zusammenhang mit Chemotherapie auftritt und einige Nebenwirkungen dieser Therapie mit einer anti-inflammatorischen Wirkung der NG erklärt werden könnten, sollten weitere Untersuchungen dieser Mechanismen durchgeführt werden.

VI. Summary

Systemic inflammation, experimentally induced by lipopolysaccharide (LPS), a component of gram-negative bacterial cell walls, leads to a brain-controlled sickness response, which includes fever, anorexia, lethargy and depression. Three different communication pathways between the peripheral immune system and the brain are known to contribute to this response: a humoral (I), a cellular (II) and a neuronal one (III). (I) Systemic inflammation induces the peripheral release of cytokines like interleukin (IL)-1 β , IL-6 and tumor necrosis factor (TNF) α . These cytokines can activate cells of the blood-brain-barrier or reach the brain through circumventricular organs – brain structures with a leaky blood-brain-barrier. Thereafter, hypothalamic nuclei get activated either directly or indirectly via secondary mediators. Subsequently, transcription factors regulate the expression of inflammatory target genes responsible for the induction of the sickness response. (II) Moreover, peripheral cytokines or LPS stimulate immune cells to migrate to the brain. In the brain, they release cytokines, which can contribute to the activation of hypothalamic nuclei. (III) In addition, sensory or vagal afferences can convey signals from the periphery to the brain. The hypothalamus-pituitary-adrenal-axis (HPA-axis) is a negative feedback mechanism and acts anti-inflammatory through corticosterone. The aim of this study was to analyze the role of the transcription factor nuclear factor (NF)-IL6 for the communication pathways between the periphery and the brain and for the induction of the sickness response.

For this purpose, mice deficient in NF-IL6 (KO) and wildtype mice (WT) were exposed to a novel environment (switch to a new cage, NES) and the stress response was monitored for 4 h. Systemic inflammation was induced by injection of a low (50 μ g/kg) or a high LPS-dose (2.5 mg/kg), controls received sterile phosphate-buffered saline (PBS). The sickness response was monitored by a telemetric system. 8 or 24 h after injection of the high LPS-dose or PBS animals were transcardially perfused, brains, blood samples and the liver were collected and analyzed using qRT-PCR, immunofluorescence, ELISA, cytokine bioassays and western blot.

KO showed normal and in tendency prolonged fever following treatment with the low LPS-dose, while fever was nearly abolished 3 – 7 h after high dose LPS-stimulation. This response was accompanied by reduced inflammation 8 h after LPS-treatment, including – compared to WT – lower IL-6 and IL-10 plasma levels and reduced hypothalamic expression of inflammatory mediators like IL-6, IL-10, TNF α , suppressor of cytokine signaling (SOCS)3 and inhibitor of NF κ B (I κ B) α as well as reduced recruitment of neutrophil granulocytes (NG) to the brain. Moreover, expression of the microsomal prostaglandin E synthase and immunoreactivity of the cyclooxygenase 2 were decreased in KO compared to WT. Knowing the pivotal role for prostaglandin (PG)E₂ as a terminal mediator for fever induction, the reduction of these rate-limiting enzymes for PGE₂ synthesis (indicative for reduced PGE₂ synthesis) might represent a potential underlying mechanism for the reduced fever in KO. 24 h after LPS-stimulation KO showed increased inflammation with higher expression of inflammatory mediators in comparison to WT. Thus, it was shown for the first time that NF-IL6 has a dual role during inflammation: mediating first pro- followed by later anti-inflammatory effects. This change in NF-IL6 function might be due to a switch between the activating (LAP) and the inhibitory (LIP) isoform of NF-IL6. Here, LPS-induced LAP was increased 8 h after treatment in the hypothalamus, while LIP was not detectable. Further studies are needed to further clarify the role of the LAP/LIP ratio for inflammation. In addition, the inhibitors of NF-IL6, namely, micro RNA (miR)155 and tribbles (Trib)1 were analyzed. However, no evidence for a contribution to the regulation of NF-IL6-activity was revealed for either of them. Nevertheless, further analyses on these negative regulators for example on Trib1 protein level could reveal more insights.

In addition, KO reacted to NES with increased locomotor activity compared to WT. Thus, NF-IL6 seems to be involved in HPA-axis activity regulation. Indeed, KO exhibited high morning corticosterone plasma levels and high proopiomelanocortin expression. As the expression of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor VIPR1, which plays a role in the regulation of circadian rhythms,

was reduced in KO compared to WT, these results might be due to some alterations of the inner clock mediated by NF-IL6.

Moreover, KO exhibited dramatically reduced basal locomotor activity, which could also be caused by alterations of the inner clock and the observed increased corticosterone levels. In addition, expression of the serotonin reuptake transporter Slc6A4 was basally increased in KO. Enhanced Slc6A4-expression, for example caused by a promoter polymorphism, can induce depressive-like behavior in humans. Thus, high expression of Slc6A4 in KO might potentially lead to depressive-like behavior and reduced activity. Interestingly, it was shown for the first time that expression of indolamine-2,3-dioxygenase was lower in KO after LPS-treatment while tryptophan-hydroxylase expression was increased. Both changes are leading to reduced kynurenine but increased serotonin synthesis. Kynurenine is known to induce, serotonin to inhibit depression. Thus, KO seem to be protected from LPS-induced depression. Overall, modulation of NF-IL6 activity might be used to control inflammation and could be a potential therapeutic target for the treatment of depression and related disorders.

To further clarify the cellular communication pathway to the brain a study with neutropenic and normal mice after stimulation with 2.5 mg/kg LPS or PBS was conducted. Neutropenic mice showed reduced expression of the chemokine CXCL1, which is important for NG migration. Thus, NG seem to amplify their own recruitment by producing CXCL1. Moreover, neutropenic mice did not show an LPS-induced increase of IL-10 expression and exhibited lower NF-IL6-immunoreactivity than normal mice. Thus, for the first time, there is evidence to suggest that NG can act anti-inflammatory via NF-IL6-dependent IL-10 expression. Interestingly, neutropenia often appears to be associated with chemotherapy and several side effects of chemotherapy might be explained by an anti-inflammatory role of NG. Overall, further investigation of these mechanisms is suggested.

VII. Abkürzungen

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ANOVA	Varianzanalyse
AP	area postrema
Arc	nucleus arcuatus
BHS	Blut-Hirn-Schranke
bzw.	beziehungsweise
CD	„cluster of differentiation“
COX2	Cyclooxygenase 2
CRH	„corticotropin releasing hormone“
CVO	circumventrikuläres Organ
DAB	D3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid
DAMP	„danger-associated molecular pattern“
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTPs	Desoxyribonucleosidtriphosphat-Moleküle
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
EGFR	„epidermal growth factor receptor“
eIF	„eucaryotic initiation factor“
ELISA	„enzyme-linked immunosorbent assay“
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ERK	„extracellular-signal regulated kinase“
FAM	6-Carboxyfluorescein
HCl	Salzsäure
HMGB1	„high-mobility group box 1“
HPA-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse
HRP	Meerrettich-Peroxidase
HT	heterozygote Tiere
ICAM1	„intracellular cell adhesion molecule 1“
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IKK	I κ B-Kinase-Komplex

Abkürzungen

IL	Interleukin
IL-1ra	IL-1-Rezeptor-Antagonist
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IQR	„interquartile-range“
IRAK	IL-1-Rezeptor assoziierte Kinase
I κ B	„inhibitor of κ B“
JAK	Janus-Kinase
KGW	Körpergewicht
KMO	Kynurenin-3-Monooxygenase
KO	homozygote NF-IL6-Knockout-Tiere
LAP	„liver-enriched activating protein“
LIP	„liver-enriched inhibitory protein“
LPS	Lipopolysaccharid
MAP	„mitogen-activated protein“
ME	eminentia mediana
miR	micro RNA
MnPO	nucleus praetoticus medianus
mPGES	mikrosomale Prostaglandin E Synthase
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2yl] 2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid
MyD	„myeloid differentiation primary response protein“
NaCl	Natriumchlorid
NDS	„normal donkey serum“
NES	„novel environment stress“
NF	„nuclear factor“
NG	neutrophile Granulozyten
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NRS	Kaninchenserum
OD	optische Dichte
OP	Operation
OVL	organum vasculosum lamina terminalis
PACAP	„pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide“
PAMP	„pathogen-associated molecular pattern“
PBS	„phosphate buffered saline“
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd

Abkürzungen

PGE2	Prostaglandin E2
PMN	polymorphnukleäre Leukozyten
POMC	proopiomelanocortin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PVN	nucleus paraventricularis
RIP	„receptor-interacting protein“
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RSK	„ribosomal s6 kinase“
s. u.	siehe unten
SAF	Natriumacetat, Essigsäure, Formalin
SCN	nucleus suprachiasmaticus
sCVO	sensorisches circumventrikuläres Organ
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SFO	organum subfornicale
SIV	„simian immunodeficiency virus“
SOCS	„suppressor of cytokine signaling“
SODD	„silencer of death domain“
ss	einzelsträngig
STAT	„signal transducer and activator of transcription“
Tb	Körperkerntemperatur
TDO	Tryptophan-2,3-Dioxygenase
TLR	toll-like Rezeptor
TMB	Tetramethyl-Benzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	TNF-Rezeptor
TPH	Tryptophanhydroxylase
TRADD	„TNFR I-associated death domain protein“
TRAF	„TNFR associated factor“
Trib1	Tribbles1
VIP	„vasoactive intestinal peptide“
VIPR	VIP-Rezeptor
WT	Wildtyp-Tiere
z. B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

VIII. Literaturverzeichnis

- Abbud, R. A., R. Kelleher und S. Melmed** (2004). "Cell-specific pituitary gene expression profiles after treatment with leukemia inhibitory factor reveal novel modulators for proopiomelanocortin expression." Endocrinology 145(2): 867-880.
- Aderem, A. und R. J. Ulevitch** (2000). "Toll-like receptors in the induction of the innate immune response." Nature 406(6797): 782-787.
- Agrawal, A., H. Cha-Molstad, D. Samols und I. Kushner** (2003). "Overexpressed nuclear factor-kappaB can participate in endogenous C-reactive protein induction, and enhances the effects of C/EBPbeta and signal transducer and activator of transcription-3." Immunology 108(4): 539-547.
- Aguilar-Morante, D., M. Cortes-Canteli, M. Sanz-Sancristobal, A. Santos und A. Perez-Castillo** (2011). "Decreased CCAAT/enhancer binding protein beta expression inhibits the growth of glioblastoma cells." Neuroscience 176: 110-119.
- Aguilar-Valles, A., W. Inoue, C. Rummel und G. N. Luheshi** (2015). "Obesity, adipokines and neuroinflammation." Neuropharmacology.
- Aguilar-Valles, A., J. Kim, S. Jung, B. Woodside und G. N. Luheshi** (2014). "Role of brain transmigrating neutrophils in depression-like behavior during systemic infection." Mol. Psychiatry 19(5): 599-606.
- Akasaka, S., M. Nomura, H. Nishii, N. Fujimoto, Y. Ueta, M. Tsutsui, H. Shimokawa, N. Yanagihara und T. Matsumoto** (2006). "The hypothalamo-pituitary axis responses to lipopolysaccharide-induced endotoxemia in mice lacking inducible nitric oxide synthase." Brain Res. 1089(1): 1-9.
- Akira, S., H. Isshiki, T. Nakajima, S. Kinoshita, Y. Nishio, S. Natsuka und T. Kishimoto** (1992). "Regulation of expression of the interleukin 6 gene: structure and function of the transcription factor NF-IL6." Ciba Found. Symp. 167: 47-62; discussion 62-47.
- Akira, S., H. Isshiki, T. Sugita, O. Tanabe, S. Kinoshita, Y. Nishio, T. Nakajima, T. Hirano und T. Kishimoto** (1990). "A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family." EMBO J. 9(6): 1897-1906.
- Alegria-Schaffer, A.** (2014). "Western blotting using chemiluminescent substrates." Methods Enzymol. 541: 251-259.
- Allen, C., P. Thornton, A. Denes, B. W. McColl, A. Pierozynski, M. Monestier, E. Pinteaux, N. J. Rothwell und S. M. Allan** (2012). "Neutrophil cerebrovascular transmigration triggers rapid neurotoxicity through release of proteases associated with decondensed DNA." J. Immunol. 189(1): 381-392.
- Almeida, M. C., F. N. Trevisan, R. C. Barros, E. C. Carnio und L. G. Branco** (1999). "Tolerance to lipopolysaccharide is related to the nitric oxide pathway." Neuroreport 10(14): 3061-3065.
- An, M. R., C. C. Hsieh, P. D. Reisner, J. P. Rabek, S. G. Scott, D. T. Kuninger und J. Papaconstantinou** (1996). "Evidence for posttranscriptional regulation of C/EBPalpha and C/EBPbeta isoform expression during the lipopolysaccharide-mediated acute-phase response." Mol. Cell. Biol. 16(5): 2295-2306.

- An, Y., Q. Chen und N. Quan** (2011). "Interleukin-1 exerts distinct actions on different cell types of the brain in vitro." J Inflamm Res 2011(4): 11-20.
- Andre, C., A. L. Dinel, G. Ferreira, S. Laye und N. Castanon** (2014). "Diet-induced obesity progressively alters cognition, anxiety-like behavior and lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior: Focus on brain indoleamine 2,3-dioxygenase activation." Brain. Behav. Immun.
- Andreis, P. G., G. Neri, A. S. Belloni, G. Mazzocchi, A. Kasprzak und G. G. Nussdorfer** (1991). "Interleukin-1 beta enhances corticosterone secretion by acting directly on the rat adrenal gland." Endocrinology 129(1): 53-57.
- Atkins, E.** (1960). "Pathogenesis of fever." Physiol. Rev. 40: 580-646.
- Avanzi, G. C., A. Cessano, M. F. Brizzi, S. C. Clark, L. Pegoraro und L. Matera** (1989). "Biological and molecular evidence for the production of IL-6 by human natural killer cells in culture." Life Sci. 45(26): 2621-2626.
- Baer, M. und P. F. Johnson** (2000). "Generation of truncated C/EBPbeta isoforms by in vitro proteolysis." J. Biol. Chem. 275(34): 26582-26590.
- Baeuerle, P. A. und D. Baltimore** (1996). "NF-kappa B: ten years after." Cell 87(1): 13-20.
- Balabanov, R., R. Washington, J. Wagnerova und P. Dore-Duffy** (1996). "CNS microvascular pericytes express macrophage-like function, cell surface integrin alpha M, and macrophage marker ED-2." Microvasc. Res. 52(2): 127-142.
- Balasubramanian, S. und R. L. Eckert** (2004). "Green tea polyphenol and curcumin inversely regulate human involucrin promoter activity via opposing effects on CCAAT/enhancer-binding protein function." J. Biol. Chem. 279(23): 24007-24014.
- Baltimore, D., M. P. Boldin, R. M. O'Connell, D. S. Rao und K. D. Taganov** (2008). "MicroRNAs: new regulators of immune cell development and function." Nat Immunol 9(8): 839-845.
- Banks, W. A.** (2005). "Blood-brain barrier transport of cytokines: a mechanism for neuropathology." Curr. Pharm. Des. 11(8): 973-984.
- Barone, F. C., M. J. Wayner, S. L. Scharoun, R. Guevara-Aguilar und H. U. Aguilar-Baturoni** (1981). "Afferent connections to the lateral hypothalamus: a horseradish peroxidase study in the rat." Brain Res. Bull. 7(1): 75-88.
- Bauer, J., T. Sminia, F. G. Wouterlood und C. D. Dijkstra** (1994). "Phagocytic activity of macrophages and microglial cells during the course of acute and chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis." J. Neurosci. Res. 38(4): 365-375.
- Bebo, B. F., Jr. und D. S. Linthicum** (1995). "Expression of mRNA for 55-kDa and 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptors in mouse cerebrovascular endothelium: effects of interleukin-1 beta, interferon-gamma and TNF-alpha on cultured cells." J. Neuroimmunol. 62(2): 161-167.
- Bechmann, I., I. Galea und V. H. Perry** (2007). "What is the blood-brain barrier (not)?" Trends Immunol 28(1): 5-11.
- Beeson, P. B.** (1948). "Temperature-elevating effect of a substance obtained from polymorphonuclear leucocytes." J. Clin. Invest. 27(4): 524.

- Berg, T., T. N. Cassel, P. E. Schwarze und M. Nord** (2002). "Glucocorticoids regulate the CCSP and CYP2B1 promoters via C/EBPbeta and delta in lung cells." Biochem. Biophys. Res. Commun. 293(3): 907-912.
- Bernardini, R., T. C. Kamilaris, A. E. Calogero, E. O. Johnson, M. T. Gomez, P. W. Gold und G. P. Chrousos** (1990). "Interactions between tumor necrosis factor-alpha, hypothalamic corticotropin-releasing hormone, and adrenocorticotropin secretion in the rat." Endocrinology 126(6): 2876-2881.
- Bernton, E. W., J. E. Beach, J. W. Holaday, R. C. Smallridge und H. G. Fein** (1987). "Release of multiple hormones by a direct action of interleukin-1 on pituitary cells." Science 238(4826): 519-521.
- Bethin, K. E., S. K. Vogt und L. J. Muglia** (2000). "Interleukin-6 is an essential, corticotropin-releasing hormone-independent stimulator of the adrenal axis during immune system activation." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97(16): 9317-9322.
- Beutler, B., D. Greenwald, J. D. Hulmes, M. Chang, Y. C. Pan, J. Mathison, R. Ulevitch und A. Cerami** (1985). "Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin." Nature 316(6028): 552-554.
- Bi, Y., X. K. Guo, H. Zhao, L. Gao, L. Wang, J. Tang und W. H. Feng** (2014). "Highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus induces prostaglandin E2 production through cyclooxygenase 1, which is dependent on the ERK1/2-p-C/EBP-beta pathway." J. Virol. 88(5): 2810-2820.
- Blahser, S.** (1988). "The ACTH-immunoreactive system in the brain of the white-crowned sparrow, *Zonotrichia leucophrys gambelii* (Passeriformes, Emberizidae)." Histochemistry 88(3-6): 309-312.
- Blatteis, C. M.** (2006). "Endotoxic fever: new concepts of its regulation suggest new approaches to its management." Pharmacol. Ther. 111(1): 194-223.
- Blatteis, C. M., S. L. Bealer, W. S. Hunter, Q. J. Llanos, R. A. Ahokas und T. A. Mashburn, Jr.** (1983). "Suppression of fever after lesions of the anteroventral third ventricle in guinea pigs." Brain Res. Bull. 11(5): 519-526.
- Boado, R. J. und W. M. Pardridge** (1994). "Differential expression of alpha-actin mRNA and immunoreactive protein in brain microvascular pericytes and smooth muscle cells." J. Neurosci. Res. 39(4): 430-435.
- Boda, E., A. Pini, E. Hoxha, R. Parolisi und F. Tempia** (2009). "Selection of reference genes for quantitative real-time RT-PCR studies in mouse brain." J. Mol. Neurosci. 37(3): 238-253.
- Bohatschek, M., A. Werner und G. Raivich** (2001). "Systemic LPS injection leads to granulocyte influx into normal and injured brain: effects of ICAM-1 deficiency." Exp. Neurol. 172(1): 137-152.
- Boisvert, J. P., T. J. Boschuetz, J. M. Resch, C. R. Mueller und S. Choi** (2011). "Serotonin mediated changes in corticotropin releasing factor mRNA expression and feeding behavior isolated to the hypothalamic paraventricular nuclei." Neurosci. Lett. 498(3): 213-217.
- Borda, J. T., X. Alvarez, M. Mohan, A. Hasegawa, A. Bernardino, S. Jean, P. Aye und A. A. Lackner** (2008). "CD163, a marker of perivascular macrophages, is up-regulated by microglia in

- simian immunodeficiency virus encephalitis after haptoglobin-hemoglobin complex stimulation and is suggestive of breakdown of the blood-brain barrier." Am. J. Pathol. 172(3): 725-737.
- Borner, T., S. Pinkernell, T. A. Lutz und T. Riediger** (2012). "Lipopolysaccharide inhibits ghrelin-excited neurons of the arcuate nucleus and reduces food intake via central nitric oxide signaling." Brain. Behav. Immun. 26(6): 867-879.
- Boulant, J. A.** (2000). "Role of the preoptic-anterior hypothalamus in thermoregulation and fever." Clin. Infect. Dis. 31 Suppl 5: S157-161.
- Boulay, D., R. Depoortere, G. Perrault, E. Borrelli und D. J. Sanger** (1999). "Dopamine D2 receptor knock-out mice are insensitive to the hypolocomotor and hypothermic effects of dopamine D2/D3 receptor agonists." Neuropharmacology 38(9): 1389-1396.
- Boulay, D., R. Depoortere, W. Rostene, G. Perrault und D. J. Sanger** (1999). "Dopamine D3 receptor agonists produce similar decreases in body temperature and locomotor activity in D3 knock-out and wild-type mice." Neuropharmacology 38(4): 555-565.
- Boutillier, A. L., D. Monnier, B. Koch und J. P. Loeffler** (1994). "Pituitary adenylyl cyclase-activating peptide: a hypophysiotropic factor that stimulates proopiomelanocortin gene transcription, and proopiomelanocortin-derived peptide secretion in corticotropic cells." Neuroendocrinology 60(5): 493-502.
- Bradford, M. M.** (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal. Biochem. 72: 248-254.
- Brightman, M. W. und T. S. Reese** (1969). "Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain." J. Cell Biol. 40(3): 648-677.
- Burnette, W. N.** (1981). "'Western blotting': electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A." Anal. Biochem. 112(2): 195-203.
- Calame, K.** (2007). "MicroRNA-155 function in B Cells." Immunity 27(6): 825-827.
- Calkhoven, C. F., C. Muller und A. Leutz** (2000). "Translational control of C/EBPalpha and C/EBPbeta isoform expression." Genes Dev. 14(15): 1920-1932.
- Cao, C., K. Matsumura, K. Yamagata und Y. Watanabe** (1997). "Involvement of cyclooxygenase-2 in LPS-induced fever and regulation of its mRNA by LPS in the rat brain." Am. J. Physiol. 272(6 Pt 2): R1712-1725.
- Cao, Z., J. Xiong, M. Takeuchi, T. Kurama und D. V. Goeddel** (1996). "TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1." Nature 383(6599): 443-446.
- Cappello, C., A. Zwergal, S. Kanclerski, S. C. Haas, J. D. Kandemir, R. Huber, S. Page und K. Brand** (2009). "C/EBPbeta enhances NF-kappaB-associated signalling by reducing the level of IkappaB-alpha." Cell. Signal. 21(12): 1918-1924.
- Cardinaux, J. R., I. Allaman und P. J. Magistretti** (2000). "Pro-inflammatory cytokines induce the transcription factors C/EBPbeta and C/EBPdelta in astrocytes." Glia 29(1): 91-97.
- Cardullo, R. A., S. Agrawal, C. Flores, P. C. Zamecnik und D. E. Wolf** (1988). "Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85(23): 8790-8794.

- Carmona, M. C., E. Hondares, M. L. Rodriguez de la Concepcion, V. Rodriguez-Sureda, J. Peinado-Onsurbe, V. Poli, R. Iglesias, F. Villarroya und M. Giralt** (2005). "Defective thermoregulation, impaired lipid metabolism, but preserved adrenergic induction of gene expression in brown fat of mice lacking C/EBPbeta." Biochem. J. 389(Pt 1): 47-56.
- Carothers, A. M., G. Urlaub, J. Mucha, D. Grunberger und L. A. Chasin** (1989). "Point mutation analysis in a mammalian gene: rapid preparation of total RNA, PCR amplification of cDNA, and Taq sequencing by a novel method." Biotechniques 7(5): 494-496, 498-499.
- Carro, M. S., W. K. Lim, M. J. Alvarez, R. J. Bollo, X. Zhao, E. Y. Snyder, E. P. Sulman, S. L. Anne, F. Doetsch, H. Colman, A. Lasorella, K. Aldape, A. Califano und A. Iavarone** (2010). "The transcriptional network for mesenchymal transformation of brain tumours." Nature 463(7279): 318-325.
- Carswell, E. A., L. J. Old, R. L. Kassel, S. Green, N. Fiore und B. Williamson** (1975). "An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 72(9): 3666-3670.
- Cartmell, T., S. Poole, A. V. Turnbull, N. J. Rothwell und G. N. Luheshi** (2000). "Circulating interleukin-6 mediates the febrile response to localised inflammation in rats." J Physiol 526 Pt 3: 653-661.
- Carvey, P. M., B. Hendey und A. J. Monahan** (2009). "The blood-brain barrier in neurodegenerative disease: a rhetorical perspective." J. Neurochem. 111(2): 291-314.
- Catron, K. M., J. R. Brickwood, C. Shang, Y. Li, M. F. Shannon und T. P. Parks** (1998). "Cooperative binding and synergistic activation by RelA and C/EBPbeta on the intercellular adhesion molecule-1 promoter." Cell Growth Differ. 9(11): 949-959.
- Chakravarty, S. und M. Herkenham** (2005). "Toll-like receptor 4 on nonhematopoietic cells sustains CNS inflammation during endotoxemia, independent of systemic cytokines." J. Neurosci. 25(7): 1788-1796.
- Chen, F., S. C. Sun, D. C. Kuh, L. J. Gaydos und L. M. Demers** (1995). "Essential role of NF-kappa B activation in silica-induced inflammatory mediator production in macrophages." Biochem. Biophys. Res. Commun. 214(3): 985-992.
- Chen, G. L. und G. M. Miller** (2012). "Advances in tryptophan hydroxylase-2 gene expression regulation: new insights into serotonin-stress interaction and clinical implications." Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 159B(2): 152-171.
- Chinery, R., J. A. Brockman, D. T. Dransfield und R. J. Coffey** (1997). "Antioxidant-induced nuclear translocation of CCAAT/enhancer-binding protein beta. A critical role for protein kinase A-mediated phosphorylation of Ser299." J. Biol. Chem. 272(48): 30356-30361.
- Chomczynski, P. und N. Sacchi** (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Anal. Biochem. 162(1): 156-159.
- Chow, J. C., D. W. Young, D. T. Golenbock, W. J. Christ und F. Gusovsky** (1999). "Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction." J. Biol. Chem. 274(16): 10689-10692.
- Christmas, S. E., A. Meager und M. Moore** (1987). "Production of interferon and tumour necrosis factor by cloned human natural cytotoxic lymphocytes and T cells." Clin. Exp. Immunol. 69(2): 441-450.

- Chui, R. und K. Dorovini-Zis** (2010). "Regulation of CCL2 and CCL3 expression in human brain endothelial cells by cytokines and lipopolysaccharide." J Neuroinflammation 7: 1.
- Cieslik, K. A., Y. Zhu, M. Shtivelband und K. K. Wu** (2005). "Inhibition of p90 ribosomal S6 kinase-mediated CCAAT/enhancer-binding protein beta activation and cyclooxygenase-2 expression by salicylate." J. Biol. Chem. 280(18): 18411-18417.
- Ciobica, A., L. Hritcu, M. Padurariu, R. Dobrin und V. Bild** (2010). "Effects of serotonin depletion on behavior and neuronal oxidative stress status in rat: relevance for anxiety and affective disorders." Adv Med Sci 55(2): 289-296.
- Clark, J. A., R. B. Flick, L. Y. Pai, I. Szalayova, S. Key, R. K. Conley, A. Y. Deutch, P. H. Hutson und E. Mezey** (2008). "Glucocorticoid modulation of tryptophan hydroxylase-2 protein in raphe nuclei and 5-hydroxytryptophan concentrations in frontal cortex of C57/Bl6 mice." Mol. Psychiatry 13(5): 498-506.
- Cloutier, A., C. Guindi, P. Larivee, C. M. Dubois, A. Amrani und P. P. McDonald** (2009). "Inflammatory cytokine production by human neutrophils involves C/EBP transcription factors." J. Immunol. 182(1): 563-571.
- Conti, B., I. Tabarean, C. Andrei und T. Bartfai** (2004). "Cytokines and fever." Front. Biosci. 9: 1433-1449.
- Coons, A. H. und M. H. Kaplan** (1950). "Localization of antigen in tissue cells; improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody." J. Exp. Med. 91(1): 1-13.
- Cooper, K. E., W. I. Cranston und A. J. Honour** (1967). "Observations on the site & mode of action of pyrogens in the rabbit brain." J Physiol 191(2): 325-337.
- Corradi, A., A. Bajetto, F. Cozzolino und A. Rubartelli** (1993). "Production and secretion of interleukin 1 receptor antagonist in monocytes and keratinocytes." Cytotechnology 11 Suppl 1: S50-52.
- Corradin, S. B., J. Mael, S. D. Donini, E. Quattrocchi und P. Ricciardi-Castagnoli** (1993). "Inducible nitric oxide synthase activity of cloned murine microglial cells." Glia 7(3): 255-262.
- Cortes-Canteli, M., R. Luna-Medina, M. Sanz-Sancristobal, A. Alvarez-Barrientos, A. Santos und A. Perez-Castillo** (2008). "CCAAT/enhancer binding protein beta deficiency provides cerebral protection following excitotoxic injury." J. Cell Sci. 121(Pt 8): 1224-1234.
- Costa, A., P. Trainer, M. Besser und A. Grossman** (1993). "Nitric oxide modulates the release of corticotropin-releasing hormone from the rat hypothalamus in vitro." Brain Res. 605(2): 187-192.
- Croniger, C., M. Trus, K. Lysek-Stupp, H. Cohen, Y. Liu, G. J. Darlington, V. Poli, R. W. Hanson und L. Reshef** (1997). "Role of the isoforms of CCAAT/enhancer-binding protein in the initiation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene transcription at birth." J. Biol. Chem. 272(42): 26306-26312.
- Cuevas, P., J. A. Gutierrez-Diaz, D. Reimers, M. Dujovny, F. G. Diaz und J. I. Ausman** (1984). "Pericyte endothelial gap junctions in human cerebral capillaries." Anat. Embryol. (Berl) 170(2): 155-159.
- Curreli, S., F. Romerio, P. Mirandola, P. Barion, K. Bemis und D. Zella** (2001). "Human primary CD4 + T cells activated in the presence of IFN-alpha 2b express functional indoleamine 2,3-dioxygenase." J. Interferon Cytokine Res. 21(6): 431-437.

- Cuturi, M. C., M. Murphy, M. P. Costa-Giomi, R. Weinmann, B. Perussia und G. Trinchieri** (1987). "Independent regulation of tumor necrosis factor and lymphotoxin production by human peripheral blood lymphocytes." J. Exp. Med. 165(6): 1581-1594.
- D'Mello, C., T. Le und M. G. Swain** (2009). "Cerebral microglia recruit monocytes into the brain in response to tumor necrosis factoralpha signaling during peripheral organ inflammation." J. Neurosci. 29(7): 2089-2102.
- Daley, J. M., T. Ivanenko-Johnston, J. S. Reichner und J. E. Albina** (2005). "Transcriptional regulation of TNF-alpha production in neutropenia." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 288(2): R409-412.
- Dallas, P. B., J. L. Flanagan, B. N. Nightingale und B. J. Morris** (1989). "Polymerase chain reaction for fast, nonradioactive detection of high- and low-risk papillomavirus types in routine cervical specimens and in biopsies." J. Med. Virol. 27(2): 105-111.
- Damm, J., G. N. Luheshi, R. Gerstberger, J. Roth und C. Rummel** (2011). "Spatiotemporal nuclear factor interleukin-6 expression in the rat brain during lipopolysaccharide-induced fever is linked to sustained hypothalamic inflammatory target gene induction." J. Comp. Neurol. 519(3): 480-505.
- Damm, J., F. Wiegand, L. M. Harden, R. Gerstberger, C. Rummel und J. Roth** (2012). "Fever, sickness behavior, and expression of inflammatory genes in the hypothalamus after systemic and localized subcutaneous stimulation of rats with the Toll-like receptor 7 agonist imiquimod." Neuroscience 201: 166-183.
- Dantzer, R., J. C. O'Connor, G. G. Freund, R. W. Johnson und K. W. Kelley** (2008). "From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain." Nat Rev Neurosci 9(1): 46-56.
- Dawson, R., Jr. und Z. Annau** (1983). "A behavioral assessment of arcuate nucleus damage after a single injection of monosodium glutamate." Neurobehav. Toxicol. Teratol. 5(4): 399-406.
- De Filippo, K., A. Dudeck, M. Hasenberg, E. Nye, N. van Rooijen, K. Hartmann, M. Gunzer, A. Roers und N. Hogg** (2013). "Mast cell and macrophage chemokines CXCL1/CXCL2 control the early stage of neutrophil recruitment during tissue inflammation." Blood 121(24): 4930-4937.
- De Kloet, E. R., G. L. Kovacs, G. Szabo, G. Telegdy, B. Bohus und D. H. Versteeg** (1982). "Decreased serotonin turnover in the dorsal hippocampus of rat brain shortly after adrenalectomy: selective normalization after corticosterone substitution." Brain Res. 239(2): 659-663.
- de Waal Malefyt, R., J. Abrams, B. Bennett, C. G. Figdor und J. E. de Vries** (1991). "Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes." J. Exp. Med. 174(5): 1209-1220.
- Dearth, L. R., J. Hutt, A. Sattler, A. Gigliotti und J. DeWille** (2001). "Expression and function of CCAAT/enhancer binding proteinbeta (C/EBPbeta) LAP and LIP isoforms in mouse mammary gland, tumors and cultured mammary epithelial cells." J. Cell. Biochem. 82(3): 357-370.
- Dempsey, E. W. und G. B. Wislocki** (1955). "An electron microscopic study of the blood-brain barrier in the rat, employing silver nitrate as a vital stain." J Biophys Biochem Cytol 1(3): 245-256.

- Descombes, P. und U. Schibler** (1991). "A liver-enriched transcriptional activator protein, LAP, and a transcriptional inhibitory protein, LIP, are translated from the same mRNA." Cell 67(3): 569-579.
- Dev, S., P. Pal, G. K. Pal, P. H. Ananthanarayanan, V. Lalitha, A. Gaur und C. Adithan** (2012). "Role of ventromedial hypothalamus on energy homeostasis in albino rats: effect of gender." Indian J. Physiol. Pharmacol. 56(2): 107-116.
- Dewberry, R., H. Holden, D. Crossman und S. Francis** (2000). "Interleukin-1 receptor antagonist expression in human endothelial cells and atherosclerosis." Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 20(11): 2394-2400.
- DiDonato, J. A., M. Hayakawa, D. M. Rothwarf, E. Zandi und M. Karin** (1997). "A cytokine-responsive IkappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB." Nature 388(6642): 548-554.
- Dinarello, C. A.** (1992). "Reduction of inflammation by decreasing production of interleukin-1 or by specific receptor antagonism." Int. J. Tissue React. 14(2): 65-75.
- Dinarello, C. A., J. G. Cannon, S. M. Wolff, H. A. Bernheim, B. Beutler, A. Cerami, I. S. Figari, M. A. Palladino, Jr. und J. V. O'Connor** (1986). "Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1." J. Exp. Med. 163(6): 1433-1450.
- Dinkel, K., F. S. Dhabhar und R. M. Sapolsky** (2004). "Neurotoxic effects of polymorphonuclear granulocytes on hippocampal primary cultures." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101(1): 331-336.
- Dlaska, M. und G. Weiss** (1999). "Central role of transcription factor NF-IL6 for cytokine and iron-mediated regulation of murine inducible nitric oxide synthase expression." J. Immunol. 162(10): 6171-6177.
- Du, B. E.** (1949). "Why are fever temperatures over 106 degrees F. rare?" Am. J. Med. Sci. 217(4): 361-368.
- Dubrave, D. B., D. R. Spriggs, J. A. Mannick und M. L. Rodrick** (1990). "Circulating human peripheral blood granulocytes synthesize and secrete tumor necrosis factor alpha." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 87(17): 6758-6761.
- Edmonds, B. K. und G. L. Edwards** (1996). "The area postrema is involved in paraquat-induced conditioned aversion behavior and neuroendocrine activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis." Brain Res. 712(1): 127-133.
- Efstratiadis, A., F. C. Kafatos, A. M. Maxam und T. Maniatis** (1976). "Enzymatic in vitro synthesis of globin genes." Cell 7(2): 279-288.
- Ejarque-Ortiz, A., M. G. Medina, J. M. Tusell, A. P. Perez-Gonzalez, J. Serratos und J. Saura** (2007). "Upregulation of CCAAT/enhancer binding protein beta in activated astrocytes and microglia." Glia 55(2): 178-188.
- Elner, V. M., W. Scales, S. G. Elner, J. Danforth, S. L. Kunkel und R. M. Strieter** (1992). "Interleukin-6 (IL-6) gene expression and secretion by cytokine-stimulated human retinal pigment epithelial cells." Exp. Eye Res. 54(3): 361-368.
- Engblom, D., S. Saha, L. Engstrom, M. Westman, L. P. Audoly, P. J. Jakobsson und A. Blomqvist** (2003). "Microsomal prostaglandin E synthase-1 is the central switch during immune-induced pyresis." Nat. Neurosci. 6(11): 1137-1138.

- Engvall, E. und P. Perlmann** (1971). "Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G." Immunochemistry 8(9): 871-874.
- Ericsson, A., K. J. Kovacs und P. E. Sawchenko** (1994). "A functional anatomical analysis of central pathways subserving the effects of interleukin-1 on stress-related neuroendocrine neurons." J. Neurosci. 14(2): 897-913.
- Ericsson, A., C. Liu, R. P. Hart und P. E. Sawchenko** (1995). "Type 1 interleukin-1 receptor in the rat brain: distribution, regulation, and relationship to sites of IL-1-induced cellular activation." J. Comp. Neurol. 361(4): 681-698.
- Eskilsson, A., E. Mirrasekhian, S. Dufour, M. Schwaninger, D. Engblom und A. Blomqvist** (2014). "Immune-induced fever is mediated by IL-6 receptors on brain endothelial cells coupled to STAT3-dependent induction of brain endothelial prostaglandin synthesis." J. Neurosci. 34(48): 15957-15961.
- Espevik, T. und J. Nissen-Meyer** (1986). "A highly sensitive cell line, WEHI 164 clone 13, for measuring cytotoxic factor/tumor necrosis factor from human monocytes." J. Immunol. Methods 95(1): 99-105.
- Fabry, Z., M. M. Waldschmidt, D. Hendrickson, J. Keiner, L. Love-Homan, F. Takei und M. N. Hart** (1992). "Adhesion molecules on murine brain microvascular endothelial cells: expression and regulation of ICAM-1 and Lgp 55." J. Neuroimmunol. 36(1): 1-11.
- Faraoni, I., F. R. Antonetti, J. Cardone und E. Bonmassar** (2009). "miR-155 gene: a typical multifunctional microRNA." Biochim. Biophys. Acta 1792(6): 497-505.
- Fensterl, V. und G. C. Sen** (2009). "Interferons and viral infections." Biofactors 35(1): 14-20.
- Fielding, C. A., R. M. McLoughlin, L. McLeod, C. S. Colmont, M. Najdovska, D. Grail, M. Ernst, S. A. Jones, N. Topley und B. J. Jenkins** (2008). "IL-6 regulates neutrophil trafficking during acute inflammation via STAT3." J. Immunol. 181(3): 2189-2195.
- Finbloom, D. S. und K. D. Winestock** (1995). "IL-10 induces the tyrosine phosphorylation of tyk2 and Jak1 and the differential assembly of STAT1 alpha and STAT3 complexes in human T cells and monocytes." J. Immunol. 155(3): 1079-1090.
- Fischler, M. P. und W. H. Reinhart** (1997). "[Fever: friend or enemy?]." Schweiz. Med. Wochenschr. 127(20): 864-870.
- Flaherty, S. F., D. T. Golenbock, F. H. Milham und R. R. Ingalls** (1997). "CD11/CD18 leukocyte integrins: new signaling receptors for bacterial endotoxin." J. Surg. Res. 73(1): 85-89.
- Foey, A. D., S. L. Parry, L. M. Williams, M. Feldmann, B. M. Foxwell und F. M. Brennan** (1998). "Regulation of monocyte IL-10 synthesis by endogenous IL-1 and TNF-alpha: role of the p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinases." J. Immunol. 160(2): 920-928.
- French, R. A., R. W. VanHoy, R. Chizzonite, J. F. Zachary, R. Dantzer, P. Parnet, R. M. Bluthé und K. W. Kelley** (1999). "Expression and localization of p80 and p68 interleukin-1 receptor proteins in the brain of adult mice." J. Neuroimmunol. 93(1-2): 194-202.
- Frumento, G., R. Rotondo, M. Tonetti, G. Damonte, U. Benatti und G. B. Ferrara** (2002). "Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase." J. Exp. Med. 196(4): 459-468.

- Fuchs, F.** (2013). Untersuchungen zur Rolle des Transkriptionsfaktors NF-IL6 in der Hypothalamus-Hypophysen-Achse bei Ratten und Mäusen nach psychologischem und inflammatorischem Stress Dissertation, Justus-Liebig-Universität, Gießen.
- Fuchs, F., J. Damm, R. Gerstberger, J. Roth und C. Rummel** (2013). "Activation of the inflammatory transcription factor nuclear factor interleukin-6 during inflammatory and psychological stress in the brain." J Neuroinflammation 10: 140.
- Fujigaki, H., K. Saito, S. Fujigaki, M. Takemura, K. Sudo, H. Ishiguro und M. Seishima** (2006). "The signal transducer and activator of transcription 1alpha and interferon regulatory factor 1 are not essential for the induction of indoleamine 2,3-dioxygenase by lipopolysaccharide: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappaB pathways, and synergistic effect of several proinflammatory cytokines." J Biochem 139(4): 655-662.
- Fukata, J., T. Usui, Y. Naitoh, Y. Nakai und H. Imura** (1989). "Effects of recombinant human interleukin-1 alpha, -1 beta, 2 and 6 on ACTH synthesis and release in the mouse pituitary tumour cell line AtT-20." J. Endocrinol. 122(1): 33-39.
- Fukuhara, C., N. Suzuki, Y. Matsumoto, Y. Nakayama, K. Aoki, G. Tsujimoto, S. I. Inouye und Y. Masuo** (1997). "Day-night variation of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) level in the rat suprachiasmatic nucleus." Neurosci. Lett. 229(1): 49-52.
- Fukui, S., R. Schwarcz, S. I. Rapoport, Y. Takada und Q. R. Smith** (1991). "Blood-brain barrier transport of kynurenines: implications for brain synthesis and metabolism." J. Neurochem. 56(6): 2007-2017.
- Gallagher, S. und D. Chakavarti** (2008). "Staining proteins in gels." J Vis Exp(17).
- Garcia-Bonilla, L., J. M. Moore, G. Racchumi, P. Zhou, J. M. Butler, C. Iadecola und J. Anrather** (2014). "Inducible nitric oxide synthase in neutrophils and endothelium contributes to ischemic brain injury in mice." J. Immunol. 193(5): 2531-2537.
- Gardiner, T. W. und E. M. Stricker** (1985). "Impaired drinking responses of rats with lesions of nucleus medianus: circadian dependence." Am. J. Physiol. 248(2 Pt 2): R224-230.
- Gasperini, S., F. Calzetti, M. P. Russo, M. De Gironcoli und M. A. Cassatella** (1995). "Regulation of GRO alpha production in human granulocytes." J. Inflamm. 45(3): 143-151.
- Gery, I., R. K. Gershon und B. H. Waksman** (1972). "Potentiation of the T-lymphocyte response to mitogens. I. The responding cell." J. Exp. Med. 136(1): 128-142.
- Giemsa, G.** (1904). "Eine Vereinfachung und Vervollkommnung meiner Methylenblau-Eosin-Färbemethode zur Erzielung der Romanowsky-Nocht'schen Chromatinfärbung." Centralblatt für Bakteriologie(32): 307-313.
- Giordano, J. und L. V. Rogers** (1989). "Peripherally administered serotonin 5-HT3 receptor antagonists reduce inflammatory pain in rats." Eur. J. Pharmacol. 170(1-2): 83-86.
- Givalois, L., J. Dornand, M. Mekaouche, M. D. Solier, A. F. Bristow, G. Ixart, P. Siaud, I. Assenmacher und G. Barbanel** (1994). "Temporal cascade of plasma level surges in ACTH, corticosterone, and cytokines in endotoxin-challenged rats." Am. J. Physiol. 267(1 Pt 2): R164-170.

- Goldbach, J. M., J. Roth und E. Zeisberger** (1997). "Fever suppression by subdiaphragmatic vagotomy in guinea pigs depends on the route of pyrogen administration." Am. J. Physiol. 272(2 Pt 2): R675-681.
- Golombek, D. A. und R. E. Rosenstein** (2010). "Physiology of circadian entrainment." Physiol. Rev. 90(3): 1063-1102.
- Gordon, C.** (2012). "Thermal physiology of laboratory mice: Defining thermoneutrality." Journal of Thermal Biology 37(8): 654-685.
- Goujon, E., P. Parnet, S. Laye, C. Combe, K. W. Kelley und R. Dantzer** (1995). "Stress downregulates lipopolysaccharide-induced expression of proinflammatory cytokines in the spleen, pituitary, and brain of mice." Brain. Behav. Immun. 9(4): 292-303.
- Gourine, A. V.** (1995). "Pharmacological evidence that nitric oxide can act as an endogenous antipyretic factor in endotoxin-induced fever in rabbits." Gen. Pharmacol. 26(4): 835-841.
- Granowitz, E. V., B. D. Clark, J. Mancilla und C. A. Dinarello** (1991). "Interleukin-1 receptor antagonist competitively inhibits the binding of interleukin-1 to the type II interleukin-1 receptor." J. Biol. Chem. 266(22): 14147-14150.
- Griffith, O. W. und D. J. Stuehr** (1995). "Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism." Annu. Rev. Physiol. 57: 707-736.
- Guillemin, G. J., S. J. Kerr, G. A. Smythe, D. G. Smith, V. Kapoor, P. J. Armati, J. Croitoru und B. J. Brew** (2001). "Kynurenine pathway metabolism in human astrocytes: a paradox for neuronal protection." J. Neurochem. 78(4): 842-853.
- Guillemin, G. J., G. Smythe, O. Takikawa und B. J. Brew** (2005). "Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase and production of quinolinic acid by human microglia, astrocytes, and neurons." Glia 49(1): 15-23.
- Guschin, D., N. Rogers, J. Briscoe, B. Witthuhn, D. Watling, F. Horn, S. Pellegrini, K. Yasukawa, P. Heinrich, G. R. Stark und et al.** (1995). "A major role for the protein tyrosine kinase JAK1 in the JAK/STAT signal transduction pathway in response to interleukin-6." EMBO J. 14(7): 1421-1429.
- Gwosdow, A. R., M. S. Kumar und H. H. Bode** (1990). "Interleukin 1 stimulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis." Am. J. Physiol. 258(1 Pt 1): E65-70.
- Hageman, R. S., A. Wagener, C. Hantschel, K. L. Svenson, G. A. Churchill und G. A. Brockmann** (2010). "High-fat diet leads to tissue-specific changes reflecting risk factors for diseases in DBA/2J mice." Physiol Genomics 42(1): 55-66.
- Haibara, A. S., W. A. Saad, J. V. Menani, L. A. Camargo und A. Renzi** (1994). "Role of lateral hypothalamus on fluid, electrolyte, and cardiovascular responses to activation of the MSA." Am. J. Physiol. 266(2 Pt 2): R496-502.
- Hannibal, J., H. M. Hsiung und J. Fahrenkrug** (2011). "Temporal phasing of locomotor activity, heart rate rhythmicity, and core body temperature is disrupted in VIP receptor 2-deficient mice." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 300(3): R519-530.
- Hannibal, J., F. Jamen, H. S. Nielsen, L. Journot, P. Brabet und J. Fahrenkrug** (2001). "Dissociation between light-induced phase shift of the circadian rhythm and clock gene

- expression in mice lacking the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide type 1 receptor." J. Neurosci. 21(13): 4883-4890.
- Hannum, C. H., C. J. Wilcox, W. P. Arend, F. G. Joslin, D. J. Dripps, P. L. Heimdahl, L. G. Armes, A. Sommer, S. P. Eisenberg und R. C. Thompson** (1990). "Interleukin-1 receptor antagonist activity of a human interleukin-1 inhibitor." Nature 343(6256): 336-340.
- Harden, L. M., I. du Plessis, J. Roth, L. C. Loram, S. Poole und H. P. Laburn** (2011). "Differences in the relative involvement of peripherally released interleukin (IL)-6, brain IL-1beta and prostanooids in mediating lipopolysaccharide-induced fever and sickness behavior." Psychoneuroendocrinology 36(5): 608-622.
- Harden, L. M., C. Rummel, H. P. Laburn, J. Damm, F. Wiegand, S. Poole, R. Gerstberger und J. Roth** (2014). "Critical role for peripherally-derived interleukin-10 in mediating the thermoregulatory manifestations of fever and hypothermia in severe forms of lipopolysaccharide-induced inflammation." Pflugers Arch. 466(7): 1451-1466.
- Harmar, A. J., H. M. Marston, S. Shen, C. Spratt, K. M. West, W. J. Sheward, C. F. Morrison, J. R. Dorin, H. D. Piggins, J. C. Reubi, J. S. Kelly, E. S. Maywood und M. H. Hastings** (2002). "The VPAC(2) receptor is essential for circadian function in the mouse suprachiasmatic nuclei." Cell 109(4): 497-508.
- Harre, E. M., J. Roth, U. Pehl, M. Kueth, R. Gerstberger und T. Hubschle** (2002). "Selected contribution: role of IL-6 in LPS-induced nuclear STAT3 translocation in sensory circumventricular organs during fever in rats." J Appl Physiol (1985) 92(6): 2657-2666.
- Hart, B. L.** (1988). "Biological basis of the behavior of sick animals." Neurosci. Biobehav. Rev. 12(2): 123-137.
- Hart, G. R., H. Gowing und J. M. Burrin** (1992). "Effects of a novel hypothalamic peptide, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, on pituitary hormone release in rats." J. Endocrinol. 134(1): 33-41.
- He, M., Z. Xu, T. Ding, D. M. Kuang und L. Zheng** (2009). "MicroRNA-155 regulates inflammatory cytokine production in tumor-associated macrophages via targeting C/EBPbeta." Cell Mol Immunol 6(5): 343-352.
- Hehlgans, T. und K. Pfeffer** (2005). "The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games." Immunology 115(1): 1-20.
- Hehlgans, T., C. Seitz, C. Lewis und D. N. Mannel** (2001). "Hypoxic upregulation of TNF receptor type 2 expression involves NF-IL-6 and is independent of HIF-1 or HIF-2." J. Interferon Cytokine Res. 21(9): 757-762.
- Heid, C. A., J. Stevens, K. J. Livak und P. M. Williams** (1996). "Real time quantitative PCR." Genome Res. 6(10): 986-994.
- Heydendaal, W. und L. Jacobson** (2009). "Glucocorticoid status affects antidepressant regulation of locus coeruleus tyrosine hydroxylase and dorsal raphe tryptophan hydroxylase gene expression." Brain Res. 1288: 69-78.
- Hirano, T., T. Taga, T. Matsuda, M. Hibi, S. Suematsu, B. Tang, M. Murakami und T. Kishimoto** (1990). "Interleukin 6 and its receptor in the immune response and hematopoiesis." Int. J. Cell Cloning 8 Suppl 1: 155-166; discussion 166-157.

- Holst, O., A. J. Ulmer, H. Brade, H. D. Flad und E. T. Rietschel** (1996). "Biochemistry and cell biology of bacterial endotoxins." FEMS Immunol. Med. Microbiol. 16(2): 83-104.
- Hsieh, C. H., H. Y. Li und J. C. Chen** (2010). "Nitric oxide and interleukin-1 β mediate noradrenergic induced corticotrophin-releasing hormone release in organotypic cultures of rat paraventricular nucleus." Neuroscience 165(4): 1191-1202.
- Hsu, W., T. K. Kerppola, P. L. Chen, T. Curran und S. Chen-Kiang** (1994). "Fos and Jun repress transcription activation by NF-IL6 through association at the basic zipper region." Mol. Cell. Biol. 14(1): 268-276.
- Hu, H. M., Q. Tian, M. Baer, C. J. Spooner, S. C. Williams, P. F. Johnson und R. C. Schwartz** (2000). "The C/EBP bZIP domain can mediate lipopolysaccharide induction of the proinflammatory cytokines interleukin-6 and monocyte chemoattractant protein-1." J. Biol. Chem. 275(21): 16373-16381.
- Ikejima, T., S. Okusawa, P. Ghezzi, J. W. van der Meer und C. A. Dinarello** (1990). "Interleukin-1 induces tumor necrosis factor (TNF) in human peripheral blood mononuclear cells in vitro and a circulating TNF-like activity in rabbits." J. Infect. Dis. 162(1): 215-223.
- Isshiki, H., S. Akira, T. Sugita, Y. Nishio, S. Hashimoto, T. Pawlowski, S. Suematsu und T. Kishimoto** (1991). "Reciprocal expression of NF-IL6 and C/EBP in hepatocytes: possible involvement of NF-IL6 in acute phase protein gene expression." New Biol. 3(1): 63-70.
- Isshiki, H., S. Akira, O. Tanabe, T. Nakajima, T. Shimamoto, T. Hirano und T. Kishimoto** (1990). "Constitutive and interleukin-1 (IL-1)-inducible factors interact with the IL-1-responsive element in the IL-6 gene." Mol. Cell. Biol. 10(6): 2757-2764.
- Ivanov, A. I. und A. A. Romanovsky** (2004). "Prostaglandin E2 as a mediator of fever: synthesis and catabolism." Front. Biosci. 9: 1977-1993.
- Janeway, C. A., Jr. und R. Medzhitov** (2002). "Innate immune recognition." Annu. Rev. Immunol. 20: 197-216.
- Jansky, L., S. Vybiral, D. Pospisilova, J. Roth, J. Dornand, E. Zeisberger und J. Kaminkova** (1995). "Production of systemic and hypothalamic cytokines during the early phase of endotoxin fever." Neuroendocrinology 62(1): 55-61.
- Johnson, W. C.** (1975). "A neglected modality in psychiatric treatment--the monoamine oxidase inhibitors." Dis. Nerv. Syst. 36(9): 521-525.
- Jonassen, R. und N. I. Landro** (2014). "Serotonin Transporter Polymorphisms (5-HTTLPR) in Emotion Processing Implications from Current Neurobiology." Prog. Neurobiol.
- Jones, A., C. Fujiyama und K. Smith** (2001). "RNA purification and quantification methods." Methods Mol Med 57: 241-253.
- Joo, K. M., Y. H. Chung, M. K. Kim, R. H. Nam, B. L. Lee, K. H. Lee und C. I. Cha** (2004). "Distribution of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors (VPAC1, VPAC2, and PAC1 receptor) in the rat brain." J. Comp. Neurol. 476(4): 388-413.
- Jorgensen, T. N., P. M. Christensen und U. Gether** (2014). "Serotonin-induced down-regulation of cell surface serotonin transporter." Neurochem. Int. 73: 107-112.

- Jung, I. D., C. M. Lee, Y. I. Jeong, J. S. Lee, W. S. Park, J. Han und Y. M. Park** (2007). "Differential regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase by lipopolysaccharide and interferon gamma in murine bone marrow derived dendritic cells." FEBS Lett. 581(7): 1449-1456.
- Kageyama, K., K. Hanada, Y. Iwasaki, S. Sakihara, T. Nigawara, J. Kasckow und T. Suda** (2007). "Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates corticotropin-releasing factor, vasopressin and interleukin-6 gene transcription in hypothalamic 4B cells." J. Endocrinol. 195(2): 199-211.
- Kanarek, R. B. und H. Dushkin** (1988). "Peripheral serotonin administration selectively reduces fat intake in rats." Pharmacol. Biochem. Behav. 31(1): 113-122.
- Kano, A., M. J. Wolfgang, Q. Gao, J. Jacoby, G. X. Chai, W. Hansen, Y. Iwamoto, J. S. Pober, R. A. Flavell und X. Y. Fu** (2003). "Endothelial cells require STAT3 for protection against endotoxin-induced inflammation." J. Exp. Med. 198(10): 1517-1525.
- Kapadia, R., K. Tureyen, K. K. Bowen, H. Kalluri, P. F. Johnson und R. Vemuganti** (2006). "Decreased brain damage and curtailed inflammation in transcription factor CCAAT/enhancer binding protein beta knockout mice following transient focal cerebral ischemia." J. Neurochem. 98(6): 1718-1731.
- Katsuura, G., A. Arimura, K. Koves und P. E. Gottschall** (1990). "Involvement of organum vasculosum of lamina terminalis and preoptic area in interleukin 1 beta-induced ACTH release." Am. J. Physiol. 258(1 Pt 1): E163-171.
- Kawamura, H., A. Ito, T. Oishi und T. Yanaga** (1984). "Influence of glucocorticoids on brain serotonin metabolism in rats." Endocrinol. Jpn. 31(5): 595-603.
- Kim, H., L. Chen, G. Lim, B. Sung, S. Wang, M. F. McCabe, G. Rusanescu, L. Yang, Y. Tian und J. Mao** (2012). "Brain indoleamine 2,3-dioxygenase contributes to the comorbidity of pain and depression." J. Clin. Invest. 122(8): 2940-2954.
- Kishimoto, T.** (1994). "Signal transduction through homo- or heterodimers of gp130." Stem Cells 12 Suppl 1: 37-44; discussion 44-35.
- Kiss-Toth, E., S. M. Bagstaff, H. Y. Sung, V. Jozsa, C. Dempsey, J. C. Caunt, K. M. Oxley, D. H. Wyllie, T. Polgar, M. Harte, A. O'Neill L, E. E. Qwarnstrom und S. K. Dower** (2004). "Human tribbles, a protein family controlling mitogen-activated protein kinase cascades." J. Biol. Chem. 279(41): 42703-42708.
- Klein, C., C. Patte-Mensah, O. Taleb, J. J. Bourguignon, M. Schmitt, F. Bihel, M. Maitre und A. G. Mensah-Nyagan** (2013). "The neuroprotector kynurenic acid increases neuronal cell survival through neprilysin induction." Neuropharmacology 70: 254-260.
- Kleppe, K., E. Ohtsuka, R. Kleppe, I. Molineux und H. G. Khorana** (1971). "Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases." J. Mol. Biol. 56(2): 341-361.
- Klir, J. J., J. L. McClellan, W. Kozak, Z. Szelenyi, G. H. Wong und M. J. Kluger** (1995). "Systemic but not central administration of tumor necrosis factor-alpha attenuates LPS-induced fever in rats." Am. J. Physiol. 268(2 Pt 2): R480-486.
- Kluger, M. J., B. O'Reilly, T. R. Shope und A. J. Vander** (1987). "Further evidence that stress hyperthermia is a fever." Physiol. Behav. 39(6): 763-766.

- Kluger, M. J. und B. A. Rothenburg** (1979). "Fever and reduced iron: their interaction as a host defense response to bacterial infection." Science 203(4378): 374-376.
- Koenig, S., G. N. Luheshi, T. Wenz, R. Gerstberger, J. Roth und C. Rummel** (2014). "Leptin is involved in age-dependent changes in response to systemic inflammation in the rat." Brain. Behav. Immun. 36: 128-138.
- Kong, E., S. Sucic, F. J. Monje, G. Savalli, W. Diao, D. Khan, M. Ronovsky, M. Cabatic, F. Koban, M. Freissmuth und D. D. Pollak** (2015). "STAT3 controls IL6-dependent regulation of serotonin transporter function and depression-like behavior." Sci Rep 5: 9009.
- Konsman, J. P., S. Vignes, L. Mackerlova, A. Bristow und A. Blomqvist** (2004). "Rat brain vascular distribution of interleukin-1 type-1 receptor immunoreactivity: relationship to patterns of inducible cyclooxygenase expression by peripheral inflammatory stimuli." J. Comp. Neurol. 472(1): 113-129.
- Kostura, M. J., M. J. Tocci, G. Limjuco, J. Chin, P. Cameron, A. G. Hillman, N. A. Chartrain und J. A. Schmidt** (1989). "Identification of a monocyte specific pre-interleukin 1 beta convertase activity." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86(14): 5227-5231.
- Kozak, W., C. A. Conn, J. J. Klir, G. H. Wong und M. J. Kluger** (1995). "TNF soluble receptor and antiserum against TNF enhance lipopolysaccharide fever in mice." Am. J. Physiol. 269(1 Pt 2): R23-29.
- Kozak, W., C. A. Conn und M. J. Kluger** (1994). "Lipopolysaccharide induces fever and depresses locomotor activity in unrestrained mice." Am. J. Physiol. 266(1 Pt 2): R125-135.
- Kozak, W. und A. Kozak** (2003). "Genetic Models in Applied Physiology. Differential role of nitric oxide synthase isoforms in fever of different etiologies: studies using Nos gene-deficient mice." J Appl Physiol (1985) 94(6): 2534-2544.
- Kozak, W., S. Wrotek und A. Kozak** (2006). "Pyrogenicity of CpG-DNA in mice: role of interleukin-6, cyclooxygenases, and nuclear factor-kappaB." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 290(4): R871-880.
- Krout, K. E., J. Kawano, T. C. Mettenleiter und A. D. Loewy** (2002). "CNS inputs to the suprachiasmatic nucleus of the rat." Neuroscience 110(1): 73-92.
- Laborit, H.** (1976). "On the mechanism of activation of the hypothalamo--pituitary--adrenal reaction to changes in the environment (the 'alarm reaction')." Resuscitation 5(1): 19-30.
- Laflamme, N. und S. Rivest** (2001). "Toll-like receptor 4: the missing link of the cerebral innate immune response triggered by circulating gram-negative bacterial cell wall components." FASEB J. 15(1): 155-163.
- Lai, C. S., J. H. Lee, C. T. Ho, C. B. Liu, J. M. Wang, Y. J. Wang und M. H. Pan** (2009). "Rosmanol potently inhibits lipopolysaccharide-induced iNOS and COX-2 expression through downregulating MAPK, NF-kappaB, STAT3 and C/EBP signaling pathways." J. Agric. Food Chem. 57(22): 10990-10998.
- Lansdorp, P. M., L. A. Aarden, J. Calafat und W. P. Zeiljemaker** (1986). "A growth-factor dependent B-cell hybridoma." Curr. Top. Microbiol. Immunol. 132: 105-113.
- Laplanche, P., J. Diorio und M. J. Meaney** (2002). "Serotonin regulates hippocampal glucocorticoid receptor expression via a 5-HT7 receptor." Brain Res. Dev. Brain Res. 139(2): 199-203.

- Lazarus, M., K. Yoshida, R. Coppari, C. E. Bass, T. Mochizuki, B. B. Lowell und C. B. Saper** (2007). "EP3 prostaglandin receptors in the median preoptic nucleus are critical for fever responses." Nat. Neurosci. 10(9): 1131-1133.
- Le Bail, O., R. Schmidt-Ullrich und A. Israel** (1993). "Promoter analysis of the gene encoding the I kappa B-alpha/MAD3 inhibitor of NF-kappa B: positive regulation by members of the rel/NF-kappa B family." EMBO J. 12(13): 5043-5049.
- LeClair, K. P., M. A. Blonar und P. A. Sharp** (1992). "The p50 subunit of NF-kappa B associates with the NF-IL6 transcription factor." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89(17): 8145-8149.
- Lee, B. H., D. Inui, G. Y. Suh, J. Y. Kim, J. Y. Kwon, J. Park, K. Tada, K. Tanaka, K. Ietsugu, K. Uehara, K. Dote, K. Tajimi, K. Morita, K. Matsuo, K. Hoshino, K. Hosokawa, K. H. Lee, K. M. Lee, M. Takatori, M. Nishimura, M. Sanui, M. Ito, M. Egi, N. Honda, N. Okayama, N. Shime, R. Tsuruta, S. Nogami, S. H. Yoon, S. Fujitani, S. O. Koh, S. Takeda, S. Saito, S. J. Hong, T. Yamamoto, T. Yokoyama, T. Yamaguchi, T. Nishiyama, T. Igarashi, Y. Kakihana und Y. Koh** (2012). "Association of body temperature and antipyretic treatments with mortality of critically ill patients with and without sepsis: multi-centered prospective observational study." Crit Care 16(1): R33.
- Lee, C. T., L. Zhong, T. A. Mace und E. A. Repasky** (2012). "Elevation in body temperature to fever range enhances and prolongs subsequent responsiveness of macrophages to endotoxin challenge." PLoS One 7(1): e30077.
- Lee, D. H., S. S. Tam, E. Wang, G. R. Taylor, R. K. Plante und C. Y. Lau** (1996). "The NF-kappa B inhibitor, tepoxalin, suppresses surface expression of the cell adhesion molecules CD62E, CD11b/CD18 and CD106." Immunol. Lett. 53(2-3): 109-113.
- Lee, H. Y., M. B. Whiteside und M. Herkenham** (1998). "Area postrema removal abolishes stimulatory effects of intravenous interleukin-1beta on hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity and c-fos mRNA in the hypothalamic paraventricular nucleus." Brain Res. Bull. 46(6): 495-503.
- Lehmann, M. L., T. Mustafa, A. M. Eiden, M. Herkenham und L. E. Eiden** (2013). "PACAP-deficient mice show attenuated corticosterone secretion and fail to develop depressive behavior during chronic social defeat stress." Psychoneuroendocrinology 38(5): 702-715.
- LeMay, L. G., A. J. Vander und M. J. Kluger** (1990). "Role of interleukin 6 in fever in rats." Am. J. Physiol. 258(3 Pt 2): R798-803.
- Leon, L. R., W. Kozak, K. Rudolph und M. J. Kluger** (1999). "An antipyretic role for interleukin-10 in LPS fever in mice." Am. J. Physiol. 276(1 Pt 2): R81-89.
- Li, H., P. Gade, W. Xiao und D. V. Kalvakolanu** (2007). "The interferon signaling network and transcription factor C/EBP-beta." Cell Mol Immunol 4(6): 407-418.
- Li, S., Y. Wang, K. Matsumura, L. R. Ballou, S. G. Morham und C. M. Blatteis** (1999). "The febrile response to lipopolysaccharide is blocked in cyclooxygenase-2(-/-), but not in cyclooxygenase-1(-/-) mice." Brain Res. 825(1-2): 86-94.
- Liu, S., C. Croniger, C. Arizmendi, M. Harada-Shiba, J. Ren, V. Poli, R. W. Hanson und J. E. Friedman** (1999). "Hypoglycemia and impaired hepatic glucose production in mice with a deletion of the C/EBPbeta gene." J. Clin. Invest. 103(2): 207-213.

- Liu, Y. W., H. P. Tseng, L. C. Chen, B. K. Chen und W. C. Chang** (2003). "Functional cooperation of simian virus 40 promoter factor 1 and CCAAT/enhancer-binding protein beta and delta in lipopolysaccharide-induced gene activation of IL-10 in mouse macrophages." J. Immunol. 171(2): 821-828.
- Livak, K. J. und T. D. Schmittgen** (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods 25(4): 402-408.
- Loeffler, K.** (2002). Anatomie und Physiologie der Haustiere. Stuttgart, Verlag Eugen Ulmer.
- Long, N. C., I. Otterness, S. L. Kunkel, A. J. Vander und M. J. Kluger** (1990). "Roles of interleukin 1 beta and tumor necrosis factor in lipopolysaccharide fever in rats." Am. J. Physiol. 259(4 Pt 2): R724-728.
- Luheshi, G., A. J. Miller, S. Brouwer, M. J. Dascombe, N. J. Rothwell und S. J. Hopkins** (1996). "Interleukin-1 receptor antagonist inhibits endotoxin fever and systemic interleukin-6 induction in the rat." Am. J. Physiol. 270(1 Pt 1): E91-95.
- Luheshi, G. N.** (1998). "Cytokines and fever. Mechanisms and sites of action." Ann. N. Y. Acad. Sci. 856: 83-89.
- Lynn, W. A., C. R. Raetz, N. Qureshi und D. T. Golenbock** (1991). "Lipopolysaccharide-induced stimulation of CD11b/CD18 expression on neutrophils. Evidence of specific receptor-based response and inhibition by lipid A-based antagonists." J. Immunol. 147(9): 3072-3079.
- Lyson, K. und S. M. McCann** (1992). "Involvement of arachidonic acid cascade pathways in interleukin-6-stimulated corticotropin-releasing factor release in vitro." Neuroendocrinology 55(6): 708-713.
- Mackowiak, P. A.** (1998). "Concepts of fever." Arch. Intern. Med. 158(17): 1870-1881.
- Mahoney, C. W., J. Shuman, S. L. McKnight, H. C. Chen und K. P. Huang** (1992). "Phosphorylation of CCAAT-enhancer binding protein by protein kinase C attenuates site-selective DNA binding." J. Biol. Chem. 267(27): 19396-19403.
- Malek, Z. S., H. Dardente, P. Pevet und S. Raison** (2005). "Tissue-specific expression of tryptophan hydroxylase mRNAs in the rat midbrain: anatomical evidence and daily profiles." Eur. J. Neurosci. 22(4): 895-901.
- Malek, Z. S., D. Sage, P. Pevet und S. Raison** (2007). "Daily rhythm of tryptophan hydroxylase-2 messenger ribonucleic acid within raphe neurons is induced by corticoid daily surge and modulated by enhanced locomotor activity." Endocrinology 148(11): 5165-5172.
- Mandi, Y., I. Ocsovszki, D. Szabo, Z. Nagy, J. Nelson und J. Molnar** (1998). "Nitric oxide production and MDR expression by human brain endothelial cells." Anticancer Res. 18(4C): 3049-3052.
- Manzel, L. J., C. L. Chin, M. A. Behlke und D. C. Look** (2009). "Regulation of bacteria-induced intercellular adhesion molecule-1 by CCAAT/enhancer binding proteins." Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 40(2): 200-210.
- March, C. J., B. Mosley, A. Larsen, D. P. Cerretti, G. Braedt, V. Price, S. Gillis, C. S. Henney, S. R. Kronheim, K. Grabstein und et al.** (1985). "Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs." Nature 315(6021): 641-647.

- Marchant, A., Z. Amraoui, C. Gueydan, C. Bruyns, O. Le Moine, P. Vandenabeele, W. Fiers, W. A. Buurman und M. Goldman** (1996). "Methylprednisolone differentially regulates IL-10 and tumour necrosis factor (TNF) production during murine endotoxaemia." Clin. Exp. Immunol. 106(1): 91-96.
- Marchetti, L., M. Klein, K. Schlett, K. Pfizenmaier und U. L. Eisel** (2004). "Tumor necrosis factor (TNF)-mediated neuroprotection against glutamate-induced excitotoxicity is enhanced by N-methyl-D-aspartate receptor activation. Essential role of a TNF receptor 2-mediated phosphatidylinositol 3-kinase-dependent NF-kappa B pathway." J. Biol. Chem. 279(31): 32869-32881.
- Maric, T., B. Woodside und G. N. Luheshi** (2014). "The effects of dietary saturated fat on basal hypothalamic neuroinflammation in rats." Brain. Behav. Immun. 36: 35-45.
- Marsh, C. B. und M. D. Wewers** (1994). "Cytokine-induced interleukin-1 receptor antagonist release in mononuclear phagocytes." Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 10(5): 521-525.
- Martin, T. L., E. J. Mufson und M. M. Mesulam** (1984). "The light side of horseradish peroxidase histochemistry." J. Histochem. Cytochem. 32(7): 793.
- Martinez, C., Y. Juarranz, C. Abad, A. Arranz, B. G. Miguel, F. Rosignoli, J. Leceta und R. P. Gomariz** (2005). "Analysis of the role of the PAC1 receptor in neutrophil recruitment, acute-phase response, and nitric oxide production in septic shock." J. Leukoc. Biol. 77(5): 729-738.
- Matsusaka, T., K. Fujikawa, Y. Nishio, N. Mukaida, K. Matsushima, T. Kishimoto und S. Akira** (1993). "Transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90(21): 10193-10197.
- Mayer, T. Z., F. A. Simard, A. Cloutier, H. Vardhan, C. M. Dubois und P. P. McDonald** (2013). "The p38-MSK1 signaling cascade influences cytokine production through CREB and C/EBP factors in human neutrophils." J. Immunol. 191(8): 4299-4307.
- Mazia, D., G. Schatten und W. Sale** (1975). "Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine. Applications to electron microscopy." J. Cell Biol. 66(1): 198-200.
- McColl, B. W., N. J. Rothwell und S. M. Allan** (2007). "Systemic inflammatory stimulus potentiates the acute phase and CXC chemokine responses to experimental stroke and exacerbates brain damage via interleukin-1- and neutrophil-dependent mechanisms." J. Neurosci. 27(16): 4403-4412.
- Micheau, O. und J. Tschopp** (2003). "Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes." Cell 114(2): 181-190.
- Millward, C. A., J. D. Heaney, D. S. Sinasac, E. C. Chu, I. R. Bederman, D. A. Gilge, S. F. Previs und C. M. Croniger** (2007). "Mice with a deletion in the gene for CCAAT/enhancer-binding protein beta are protected against diet-induced obesity." Diabetes 56(1): 161-167.
- Milton, A. S.** (1998). "Prostaglandins and fever." Prog. Brain Res. 115: 129-139.
- Milton, A. S. und S. Wendlandt** (1971). "Effects on body temperature of prostaglandins of the A, E and F series on injection into the third ventricle of unanaesthetized cats and rabbits." J. Physiol 218(2): 325-336.

- Minano, F. J., E. Tavares und R. Maldonado** (2004). "Role of endogenous macrophage inflammatory protein-2 in regulating fever induced by bacterial endotoxin in normal and immunosuppressed rats." Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 31(10): 723-731.
- Ming, W. J., L. Bersani und A. Mantovani** (1987). "Tumor necrosis factor is chemotactic for monocytes and polymorphonuclear leukocytes." J. Immunol. 138(5): 1469-1474.
- Miossec, P., D. Cavender und M. Ziff** (1986). "Production of interleukin 1 by human endothelial cells." J. Immunol. 136(7): 2486-2491.
- Moffett, J. R., K. L. Blinder, C. N. Venkateshan und M. A. Namboodiri** (1998). "Differential effects of kynurenine and tryptophan treatment on quinolate immunoreactivity in rat lymphoid and non-lymphoid organs." Cell Tissue Res. 293(3): 525-534.
- Moore, R. N., J. J. Oppenheim, J. J. Farrar, C. S. Carter, Jr., A. Waheed und R. K. Shadduck** (1980). "Production of lymphocyte-activating factor (Interleukin 1) by macrophages activated with colony-stimulating factors." J. Immunol. 125(3): 1302-1305.
- Mosmann, T.** (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." J. Immunol. Methods 65(1-2): 55-63.
- Mullen, P. G., A. C. Windsor, C. J. Walsh, A. A. Fowler, 3rd und H. J. Sugerman** (1995). "Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 selectively regulate neutrophil function in vitro." J. Surg. Res. 58(2): 124-130.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn und H. Erlich** (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 51 Pt 1: 263-273.
- Muzio, M., J. Ni, P. Feng und V. M. Dixit** (1997). "IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling." Science 278(5343): 1612-1615.
- Myers, R. D.** (1981). "Serotonin and thermoregulation: old and new views." J. Physiol. (Paris). 77(2-3): 505-513.
- Myint, A. M.** (2012). "Kynurenines: from the perspective of major psychiatric disorders." FEBS J 279(8): 1375-1385.
- Nadeau, S. und S. Rivest** (1999). "Effects of circulating tumor necrosis factor on the neuronal activity and expression of the genes encoding the tumor necrosis factor receptors (p55 and p75) in the rat brain: a view from the blood-brain barrier." Neuroscience 93(4): 1449-1464.
- Nadjar, A., C. Combe, S. Laye, V. Tridon, R. Dantzer, T. Amedee und P. Parnet** (2003). "Nuclear factor kappaB nuclear translocation as a crucial marker of brain response to interleukin-1. A study in rat and interleukin-1 type I deficient mouse." J. Neurochem. 87(4): 1024-1036.
- Nahas, G. G., M. L. Tannieres und J. F. Lennon** (1971). "Direct measurement of leukocyte motility: effects of pH and temperature." Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 138(1): 350-352.
- Nakajima, T., S. Kinoshita, T. Sasagawa, K. Sasaki, M. Naruto, T. Kishimoto und S. Akira** (1993). "Phosphorylation at threonine-235 by a ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade is essential for transcription factor NF-IL6." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90(6): 2207-2211.

- Nakamori, T., A. Morimoto, K. Yamaguchi, T. Watanabe und N. Murakami** (1994). "Interleukin-1 beta production in the rabbit brain during endotoxin-induced fever." J Physiol 476(1): 177-186.
- Nakane, P. K. und G. B. Pierce, Jr.** (1966). "Enzyme-labeled antibodies: preparation and application for the localization of antigens." J. Histochem. Cytochem. 14(12): 929-931.
- Narvanen, O., I. Jokinen, K. Poikonen, L. Rasanen und H. Arvilommi** (1986). "Effect of elevated temperature on human immunoglobulin synthesis, lymphokine production and lymphocyte proliferation in vitro." Acta Pathol Microbiol Immunol Scand C 94(6): 239-244.
- Navarro, S., N. Debili, J. F. Bernaudin, W. Vainchenker und J. Doly** (1989). "Regulation of the expression of IL-6 in human monocytes." J. Immunol. 142(12): 4339-4345.
- Nickel, R., A. Schummerle und E. Seiferle** (2004). Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band IV Nervensystem, Sinnesorgane, Endokrine Drüsen. Stuttgart, Parey-Verlag.
- Nicklas, W., P. Baneux, R. Boot, T. Decelle, A. A. Deeny, M. Fumanelli und B. Illgen-Wilcke** (2002). "Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units." Lab. Anim. 36(1): 20-42.
- Niehof, M., K. Streetz, T. Rakemann, S. C. Bischoff, M. P. Manns, F. Horn und C. Trautwein** (2001). "Interleukin-6-induced tethering of STAT3 to the LAP/C/EBPbeta promoter suggests a new mechanism of transcriptional regulation by STAT3." J. Biol. Chem. 276(12): 9016-9027.
- Nishino, H., K. Kiyomi und C. M. Brooks** (1976). "The role of suprachiasmatic nuclei of the hypothalamus in the production of circadian rhythm." Brain Res. 112(1): 45-59.
- Norioka, K., M. Hara, M. Harigai, A. Kitani, T. Hirose, K. Suzuki, M. Kawakami, H. Tabata, M. Kawagoe und H. Nakamura** (1988). "Production of B cell stimulatory factor-2/interleukin-6 activity by human endothelial cells." Biochem. Biophys. Res. Commun. 153(3): 1045-1050.
- O'Connell, R. M., K. D. Taganov, M. P. Boldin, G. Cheng und D. Baltimore** (2007). "MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104(5): 1604-1609.
- O'Garra, A., G. Stapleton, V. Dhar, M. Pearce, J. Schumacher, H. Rugo, D. Barbis, A. Stall, J. Cupp, K. Moore und et al.** (1990). "Production of cytokines by mouse B cells: B lymphomas and normal B cells produce interleukin 10." Int. Immunol. 2(9): 821-832.
- OConnor, J. P., S; Owens, WA; Green, A; Redus, L; Parrott, JM; Delgado, JN; Daws,LC; Lodge, DJ** (2014). "Aberrant dopamine transporter function in kynurenine 3-monooxygenase knockout mice: Implications for psychosis." Brain. Behav. Immun. 40(Supplement, September 2014): e42-e43.
- Ogawa, T., W. R. Matson, M. F. Beal, R. H. Myers, E. D. Bird, P. Milbury und S. Saso** (1992). "Kynurenine pathway abnormalities in Parkinson's disease." Neurology 42(9): 1702-1706.
- Ohinata, K., K. Suetsugu, Y. Fujiwara und M. Yoshikawa** (2006). "Activation of prostaglandin E receptor EP4 subtype suppresses food intake in mice." Prostaglandins Other Lipid Mediat. 81(1-2): 31-36.
- Oka, T.** (2004). "Prostaglandin E2 as a mediator of fever: the role of prostaglandin E (EP) receptors." Front. Biosci. 9: 3046-3057.

- Okuda, S., N. Nishiyama, H. Saito und H. Katsuki** (1998). "3-Hydroxykynurenine, an endogenous oxidative stress generator, causes neuronal cell death with apoptotic features and region selectivity." J. Neurochem. 70(1): 299-307.
- Ossipow, V., P. Descombes und U. Schibler** (1993). "CCAAT/enhancer-binding protein mRNA is translated into multiple proteins with different transcription activation potentials." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90(17): 8219-8223.
- Ota, K., T. Katafuchi, A. Takaki und T. Hori** (1997). "AV3V neurons that send axons to hypothalamic nuclei respond to the systemic injection of IL-1beta." Am. J. Physiol. 272(2 Pt 2): R532-540.
- Pappenheim, A.** (1919). Technik und Methodologie der klinischen Blutuntersuchung nebst e. Anh. enth. auch die histologische Färbung d. hämopoetischen Gewebe : Ein Leitfaden f. Anfänger, Studierende u. prakt. Ärzte. Leipzig, Dr. W. Klinkhardt.
- Pardridge, W. M. und W. H. Oldendorf** (1975). "Kinetic analysis of blood-brain barrier transport of amino acids." Biochim. Biophys. Acta 401(1): 128-136.
- Paxinos, G., Franklin, Keith B. J.** (2001). The Mouse Brain In Stereotaxic Coordinates. San Diego, California, USA, Academic Press.
- Pecchi, E., M. Dallaporta, S. Thirion, C. Salvat, F. Berenbaum, A. Jean und J. D. Troadec** (2006). "Involvement of central microsomal prostaglandin E synthase-1 in IL-1beta-induced anorexia." Physiol Genomics 25(3): 485-492.
- Perotti, C. A., M. S. Nogueira, J. Antunes-Rodrigues und E. C. Carnio** (1999). "Effects of a neuronal nitric oxide synthase inhibitor on lipopolysaccharide-induced fever." Braz. J. Med. Biol. Res. 32(11): 1381-1387.
- Pfeffer, K., T. Matsuyama, T. M. Kundig, A. Wakeham, K. Kishihara, A. Shahinian, K. Wiegmann, P. S. Ohashi, M. Kronke und T. W. Mak** (1993). "Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to L. monocytogenes infection." Cell 73(3): 457-467.
- Pieper, C., P. Pieloch und H. J. Galla** (2013). "Pericytes support neutrophil transmigration via interleukin-8 across a porcine co-culture model of the blood-brain barrier." Brain Res. 1524: 1-11.
- Pochwat, B., A. Palucha-Poniewiera, B. Szewczyk, A. Pilc und G. Nowak** (2014). "NMDA antagonists under investigation for the treatment of major depressive disorder." Expert Opin Investig Drugs 23(9): 1181-1192.
- Polfliet, M. M., B. O. Fabrick, W. P. Daniels, C. D. Dijkstra und T. K. van den Berg** (2006). "The rat macrophage scavenger receptor CD163: expression, regulation and role in inflammatory mediator production." Immunobiology 211(6-8): 419-425.
- Poli, V., F. P. Mancini und R. Cortese** (1990). "IL-6DBP, a nuclear protein involved in interleukin-6 signal transduction, defines a new family of leucine zipper proteins related to C/EBP." Cell 63(3): 643-653.
- Pope, R. M., A. Leutz und S. A. Ness** (1994). "C/EBP beta regulation of the tumor necrosis factor alpha gene." J. Clin. Invest. 94(4): 1449-1455.

- Pournajafi Nazarloo, H., T. Takao, T. Taguchi, H. Ito und K. Hashimoto** (2003). "Modulation of type I IL-1 receptor and IL-1 beta mRNA expression followed by endotoxin treatment in the corticotropin-releasing hormone-deficient mouse." J. Neuroimmunol. 140(1-2): 102-108.
- Proescholdt, M. G., S. Chakravarty, J. A. Foster, S. B. Foti, E. M. Briley und M. Herkenham** (2002). "Intracerebroventricular but not intravenous interleukin-1beta induces widespread vascular-mediated leukocyte infiltration and immune signal mRNA expression followed by brain-wide glial activation." Neuroscience 112(3): 731-749.
- Prudhomme, J. G., I. W. Sherman, K. M. Land, A. V. Moses, S. Stenglein und J. A. Nelson** (1996). "Studies of Plasmodium falciparum cytoadherence using immortalized human brain capillary endothelial cells." Int. J. Parasitol. 26(6): 647-655.
- Qian, J., L. Zhu, Q. Li, N. Belevych, Q. Chen, F. Zhao, S. Herness und N. Quan** (2012). "Interleukin-1R3 mediates interleukin-1-induced potassium current increase through fast activation of Akt kinase." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 109(30): 12189-12194.
- Quan, N., E. L. Stern, M. B. Whiteside und M. Herkenham** (1999). "Induction of pro-inflammatory cytokine mRNAs in the brain after peripheral injection of subseptic doses of lipopolysaccharide in the rat." J. Neuroimmunol. 93(1-2): 72-80.
- Ramji, D. P. und P. Foka** (2002). "CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation." Biochem. J. 365(Pt 3): 561-575.
- Raux-Demay, M. C. und F. Girard** (1985). "The physiology of corticotropin-releasing factor (CRF)." Reprod. Nutr. Dev. 25(5): 931-943.
- Ravimohan, S., L. Gama, S. A. Barber und J. E. Clements** (2010). "Regulation of SIV mac 239 basal long terminal repeat activity and viral replication in macrophages: functional roles of two CCAAT/enhancer-binding protein beta sites in activation and interferon beta-mediated suppression." J. Biol. Chem. 285(4): 2258-2273.
- Re, F., M. Mengozzi, M. Muzio, C. A. Dinarello, A. Mantovani und F. Colotta** (1993). "Expression of interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) by human circulating polymorphonuclear cells." Eur. J. Immunol. 23(2): 570-573.
- Rehm T, L. H.** (2010). Der Experimentator: Proteinbiochemie / Proteomics. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.
- Reinhold, A. C. und J. Ekstrom** (2004). "Expressions of CCAAT-enhancer-binding proteins and c-Myc in the parotid gland of the rat: in vivo effects of isoprenaline, bethanechol, vasoactive intestinal peptide and food intake." Arch. Oral Biol. 49(5): 345-354.
- Renart, J., J. Reiser und G. R. Stark** (1979). "Transfer of proteins from gels to diazobenzylxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 76(7): 3116-3120.
- Ribes, S., T. Regen, T. Meister, S. C. Tauber, S. Schutze, A. Mildner, M. Mack, U. K. Hanisch und R. Nau** (2013). "Resistance of the brain to Escherichia coli K1 infection depends on MyD88 signaling and the contribution of neutrophils and monocytes." Infect. Immun. 81(5): 1810-1819.
- Riedel, W.** (2000). "Role of nitric oxide in the control of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis." Z. Rheumatol. 59 Suppl 2: II/36-42.

- Riediger, T., C. Cordani, C. S. Potes und T. A. Lutz** (2010). "Involvement of nitric oxide in lipopolysaccharide induced anorexia." Pharmacol. Biochem. Behav. 97(1): 112-120.
- Rietschel, E. T., T. Kirikae, F. U. Schade, U. Mamat, G. Schmidt, H. Loppnow, A. J. Ulmer, U. Zahringer, U. Seydel, F. Di Padova und et al.** (1994). "Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function." FASEB J. 8(2): 217-225.
- Robinson, C. M., P. T. Hale und J. M. Carlin** (2005). "The role of IFN-gamma and TNF-alpha-responsive regulatory elements in the synergistic induction of indoleamine dioxygenase." J. Interferon Cytokine Res. 25(1): 20-30.
- Romanovsky, A. A.** (2007). "Thermoregulation: some concepts have changed. Functional architecture of the thermoregulatory system." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 292(1): R37-46.
- Ross, G., T. Hubschle, U. Pehl, H. A. Braun, K. Voigt, R. Gerstberger und J. Roth** (2003). "Fever induction by localized subcutaneous inflammation in guinea pigs: the role of cytokines and prostaglandins." J Appl Physiol (1985) 94(4): 1395-1402.
- Ross, G., J. Roth, B. Storr, K. Voigt und E. Zeisberger** (2000). "Afferent nerves are involved in the febrile response to injection of LPS into artificial subcutaneous chambers in guinea pigs." Physiol. Behav. 71(3-4): 305-313.
- Roth, J., E. M. Harre, C. Rummel, R. Gerstberger und T. Hubschle** (2004). "Signaling the brain in systemic inflammation: role of sensory circumventricular organs." Front. Biosci. 9: 290-300.
- Roth, J., D. Martin, B. Storr und E. Zeisberger** (1998). "Neutralization of pyrogen-induced tumour necrosis factor by its type 1 soluble receptor in guinea-pigs: effects on fever and interleukin-6 release." J Physiol 509 (Pt 1): 267-275.
- Roth, J., B. Storr, J. Goldbach, K. Voigt und E. Zeisberger** (1999). "Dose-dependent attenuation of lipopolysaccharide-fever by inhibitors of inducible nitric oxide-synthase in guinea pigs." Eur. J. Pharmacol. 383(2): 177-187.
- Roth, J., B. Storr, K. Voigt und E. Zeisberger** (1998). "Inhibition of nitric oxide synthase results in a suppression of interleukin-1beta-induced fever in rats." Life Sci. 62(22): PL 345-350.
- Roy, M., J. F. Richard, A. Dumas und L. Vallieres** (2012). "CXCL1 can be regulated by IL-6 and promotes granulocyte adhesion to brain capillaries during bacterial toxin exposure and encephalomyelitis." J Neuroinflammation 9: 18.
- Rubartelli, A. und M. T. Lotze** (2007). "Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox." Trends Immunol 28(10): 429-436.
- Rummel, C., R. Gerstberger, J. Roth und T. Hubschle** (2011). "Parthenolide attenuates LPS-induced fever, circulating cytokines and markers of brain inflammation in rats." Cytokine 56(3): 739-748.
- Rummel, C., T. Hubschle, R. Gerstberger und J. Roth** (2004). "Nuclear translocation of the transcription factor STAT3 in the guinea pig brain during systemic or localized inflammation." J Physiol 557(Pt 2): 671-687.
- Rummel, C., W. Inoue, S. Poole und G. N. Luheshi** (2010). "Leptin regulates leukocyte recruitment into the brain following systemic LPS-induced inflammation." Mol. Psychiatry 15(5): 523-534.

- Rummel, C., W. Inoue, C. Sachot, S. Poole, T. Hubschle und G. N. Luheshi** (2008). "Selective contribution of interleukin-6 and leptin to brain inflammatory signals induced by systemic LPS injection in mice." J. Comp. Neurol. 511(3): 373-395.
- Rummel, C., K. Matsumura und G. N. Luheshi** (2011). "Circulating IL-6 contributes to peripheral LPS-induced mPGES-1 expression in the rat brain." Brain Res. Bull. 86(5-6): 319-325.
- Rummel, C., C. Sachot, S. Poole und G. N. Luheshi** (2006). "Circulating interleukin-6 induces fever through a STAT3-linked activation of COX-2 in the brain." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 291(5): R1316-1326.
- Rummel, C., T. Voss, K. Matsumura, S. Korte, R. Gerstberger, J. Roth und T. Hubschle** (2005). "Nuclear STAT3 translocation in guinea pig and rat brain endothelium during systemic challenge with lipopolysaccharide and interleukin-6." J. Comp. Neurol. 491(1): 1-14.
- Ruocco, M. R., X. Chen, C. Ambrosino, E. Dragonetti, W. Liu, M. Mallardo, G. De Falco, C. Palmieri, G. Franzoso, I. Quinto, S. Venuta und G. Scala** (1996). "Regulation of HIV-1 long terminal repeats by interaction of C/EBP(NF-IL6) and NF-kappaB/Rel transcription factors." J. Biol. Chem. 271(37): 22479-22486.
- Saha, S., L. Engstrom, L. Mackerlova, P. J. Jakobsson und A. Blomqvist** (2005). "Impaired febrile responses to immune challenge in mice deficient in microsomal prostaglandin E synthase-1." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 288(5): R1100-1107.
- Saletu, B., M. Schjerve, J. Grunberger, H. Schanda und O. H. Arnold** (1977). "Fluvoxamine-a new serotonin re-uptake inhibitor: first clinical and psychometric experiences in depressed patients." J. Neural Transm. 41(1): 17-36.
- Satomi, N., K. Haranaka und O. Kunii** (1981). "Research on the production site of tumor necrosis factor (TNF)." Jpn. J. Exp. Med. 51(6): 317-322.
- Savitz, J., R. Dantzer, B. E. Wurfel, T. A. Victor, B. N. Ford, J. Bodurka, P. S. Bellgowan, T. K. Teague und W. C. Drevets** (2015). "Neuroprotective kynurenine metabolite indices are abnormally reduced and positively associated with hippocampal and amygdalar volume in bipolar disorder." Psychoneuroendocrinology 52: 200-211.
- Sawchenko, P. E. und L. W. Swanson** (1982). "The organization of noradrenergic pathways from the brainstem to the paraventricular and supraoptic nuclei in the rat." Brain Res. 257(3): 275-325.
- Sayers, G. und R. Portanova** (1974). "Secretion of ACTH by isolated anterior pituitary cells: kinetics of stimulation of corticotropin-releasing factor and of inhibition by corticosterone." Endocrinology 94(6): 1723-1730.
- Scammell, T. E., J. K. Elmquist, J. D. Griffin und C. B. Saper** (1996). "Ventromedial preoptic prostaglandin E2 activates fever-producing autonomic pathways." J. Neurosci. 16(19): 6246-6254.
- Scapini, P., J. A. Lapinet-Vera, S. Gasperini, F. Calzetti, F. Bazzoni und M. A. Cassatella** (2000). "The neutrophil as a cellular source of chemokines." Immunol. Rev. 177: 195-203.
- Schagger, H. und G. von Jagow** (1987). "Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa." Anal. Biochem. 166(2): 368-379.

- Schonfelder, U., A. Hofer, M. Paul und R. H. Funk (1998). "In situ observation of living pericytes in rat retinal capillaries." Microvasc. Res. 56(1): 22-29.
- Schroder, A. K., M. von der Ohe, U. Kolling, J. Altstaedt, P. Uciechowski, D. Fleischer, K. Dalhoff, X. Ju, M. Zenke, N. Heussen und L. Rink (2006). "Polymorphonuclear leucocytes selectively produce anti-inflammatory interleukin-1 receptor antagonist and chemokines, but fail to produce pro-inflammatory mediators." Immunology 119(3): 317-327.
- Schulman, C. I., N. Namias, J. Doherty, R. J. Manning, P. Li, A. Elhaddad, D. Lasko, J. Amortegui, C. J. Dy, L. Dlugasch, G. Baracco und S. M. Cohn (2005). "The effect of antipyretic therapy upon outcomes in critically ill patients: a randomized, prospective study." Surg Infect (Larchmt) 6(4): 369-375.
- Schwaninger, M., N. Petersen, S. Prinz, S. Sallmann, M. Neher und M. Spranger (2000). "Adenosine-induced expression of interleukin-6 in astrocytes through protein kinase A and NF-IL-6." Glia 31(1): 51-58.
- Schwarz, M. J., G. J. Guillemin, S. J. Teipel, K. Buerger und H. Hampel (2013). "Increased 3-hydroxykynurenine serum concentrations differentiate Alzheimer's disease patients from controls." Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci. 263(4): 345-352.
- Screpanti, I., L. Romani, P. Musiani, A. Modesti, E. Fattori, D. Lazzaro, C. Sellitto, S. Scarpa, D. Bellavia, G. Lattanzio und et al. (1995). "Lymphoproliferative disorder and imbalanced T-helper response in C/EBP beta-deficient mice." EMBO J. 14(9): 1932-1941.
- Sehic, E. und C. M. Blatteis (1996). "Blockade of lipopolysaccharide-induced fever by subdiaphragmatic vagotomy in guinea pigs." Brain Res. 726(1-2): 160-166.
- Sehic, E., M. Szekely, A. L. Ungar, A. Oladehin und C. M. Blatteis (1996). "Hypothalamic prostaglandin E2 during lipopolysaccharide-induced fever in guinea pigs." Brain Res. Bull. 39(6): 391-399.
- Selye, H. (1955). "The stress concept in 1955." J. Chronic Dis. 2(5): 583-592.
- Serhan, C. N., N. Chiang, J. Dalli und B. D. Levy (2014). "Lipid Mediators in the Resolution of Inflammation." Cold Spring Harb Perspect Biol.
- Serrats, J., J. C. Schiltz, B. Garcia-Bueno, N. van Rooijen, T. M. Reyes und P. E. Sawchenko (2010). "Dual roles for perivascular macrophages in immune-to-brain signaling." Neuron 65(1): 94-106.
- Shaftel, S. S., T. J. Carlson, J. A. Olschowka, S. Kyrkanides, S. B. Matousek und M. K. O'Banion (2007). "Chronic interleukin-1beta expression in mouse brain leads to leukocyte infiltration and neutrophil-independent blood brain barrier permeability without overt neurodegeneration." J. Neurosci. 27(35): 9301-9309.
- Shalaby, M. R., M. A. Palladino, Jr., S. E. Hirabayashi, T. E. Eessalu, G. D. Lewis, H. M. Shepard und B. B. Aggarwal (1987). "Receptor binding and activation of polymorphonuclear neutrophils by tumor necrosis factor-alpha." J. Leukoc. Biol. 41(3): 196-204.
- Sharp, B. M., S. G. Matta, P. K. Peterson, R. Newton, C. Chao und K. McAllen (1989). "Tumor necrosis factor-alpha is a potent ACTH secretagogue: comparison to interleukin-1 beta." Endocrinology 124(6): 3131-3133.

- Shea-Donohue, T., K. Thomas, M. J. Cody, Z. Aiping, L. J. Detolla, K. M. Kopydlowski, M. Fukata, S. A. Lira und S. N. Vogel** (2008). "Mice deficient in the CXCR2 ligand, CXCL1 (KC/GRO- α), exhibit increased susceptibility to dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis." Innate Immun 14(2): 117-124.
- Shibata, M. und C. M. Blatteis** (1991). "Human recombinant tumor necrosis factor and interferon affect the activity of neurons in the organum vasculosum laminae terminalis." Brain Res. 562(2): 323-326.
- Shichita, T., M. Ito und A. Yoshimura** (2014). "Post-ischemic inflammation regulates neural damage and protection." Front Cell Neurosci 8: 319.
- Shimizu, T., S. Nomiya, F. Hirata und O. Hayaishi** (1978). "Indoleamine 2,3-dioxygenase. Purification and some properties." J. Biol. Chem. 253(13): 4700-4706.
- Shukaliak, J. A. und K. Dorovini-Zis** (2000). "Expression of the beta-chemokines RANTES and MIP-1 beta by human brain microvessel endothelial cells in primary culture." J. Neuropathol. Exp. Neurol. 59(5): 339-352.
- Sibille, E. und D. A. Lewis** (2006). "SERT-ainly involved in depression, but when?" A. J. Psychiatry 163(1): 8-11.
- Simpson, J. B. und A. Routtenberg** (1973). "Subfornical organ: site of drinking elicitation by angiotensin II." Science 181(4105): 1172-1175.
- Sims, J. E., M. A. Gayle, J. L. Slack, M. R. Alderson, T. A. Bird, J. G. Giri, F. Colotta, F. Re, A. Mantovani, K. Shanebeck und et al.** (1993). "Interleukin 1 signaling occurs exclusively via the type I receptor." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90(13): 6155-6159.
- Singh, A. K. und Y. Jiang** (2004). "How does peripheral lipopolysaccharide induce gene expression in the brain of rats?" Toxicology 201(1-3): 197-207.
- Siso, S., M. Jeffrey und L. Gonzalez** (2010). "Sensory circumventricular organs in health and disease." Acta Neuropathol 120(6): 689-705.
- Small, C. I., G. A. Lyles und K. C. Breen** (2004). "Inducible form of nitric oxide synthase expression in rat cortical neuronal cells in vitro." Neurobiol. Dis. 17(1): 70-76.
- Smink, J. J. und A. Leutz** (2010). "Rapamycin and the transcription factor C/EBPbeta as a switch in osteoclast differentiation: implications for lytic bone diseases." J Mol Med (Berl) 88(3): 227-233.
- Smith, B. K. und M. J. Kluger** (1992). "Human IL-1 receptor antagonist partially suppresses LPS fever but not plasma levels of IL-6 in Fischer rats." Am. J. Physiol. 263(3 Pt 2): R653-655.
- Smith, E. M., P. Cadet, G. B. Stefano, M. R. Opp und T. K. Hughes, Jr.** (1999). "IL-10 as a mediator in the HPA axis and brain." J. Neuroimmunol. 100(1-2): 140-148.
- Solarewicz, J. Z., M. Angoa-Perez, D. M. Kuhn und J. H. Mateika** (2014). "The sleep-wake cycle and motor activity, but not temperature, are disrupted over the light-dark cycle in mice genetically depleted of serotonin." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol: ajpregu 00400 02014.
- Song, Y., H. J. Park, S. N. Kang, S. H. Jang, S. J. Lee, Y. G. Ko, G. S. Kim und J. H. Cho** (2013). "Blueberry peel extracts inhibit adipogenesis in 3T3-L1 cells and reduce high-fat diet-induced obesity." PLoS One 8(7): e69925.

- Soszynski, D.** (2001). "The inhibition of nitric oxide synthase suppresses LPS- and psychological-stress-induced fever in rats." Physiol. Behav. 72(1-2): 65-72.
- Spangelo, B. L., A. M. Judd, P. C. Isakson und R. M. MacLeod** (1991). "Interleukin-1 stimulates interleukin-6 release from rat anterior pituitary cells in vitro." Endocrinology 128(6): 2685-2692.
- Sreedharan, S. P., J. X. Huang, M. C. Cheung und E. J. Goetzl** (1995). "Structure, expression, and chromosomal localization of the type I human vasoactive intestinal peptide receptor gene." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 92(7): 2939-2943.
- Starr, R., T. A. Willson, E. M. Viney, L. J. Murray, J. R. Rayner, B. J. Jenkins, T. J. Gonda, W. S. Alexander, D. Metcalf, N. A. Nicola und D. J. Hilton** (1997). "A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling." Nature 387(6636): 917-921.
- Steffen, M., M. Abboud, G. K. Potter, Y. P. Yung und M. A. Moore** (1989). "Presence of tumour necrosis factor or a related factor in human basophil/mast cells." Immunology 66(3): 445-450.
- Stein, B., P. C. Cogswell und A. S. Baldwin, Jr.** (1993). "Functional and physical associations between NF-kappa B and C/EBP family members: a Rel domain-bZIP interaction." Mol. Cell. Biol. 13(7): 3964-3974.
- Steiner, J., M. Walter, T. Gos, G. J. Guillemin, H. G. Bernstein, Z. Sarnyai, C. Mawrin, R. Brisch, H. Bielau, L. Meyer zu Schwabedissen, B. Bogerts und A. M. Myint** (2011). "Severe depression is associated with increased microglial quinolinic acid in subregions of the anterior cingulate gyrus: evidence for an immune-modulated glutamatergic neurotransmission?" J Neuroinflammation 8: 94.
- Stephan, F. K. und I. Zucker** (1972). "Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 69(6): 1583-1586.
- Stephanou, A., A. Okosi, R. A. Knight, H. S. Chowdrey und D. S. Latchman** (1997). "C/EBP activates the human corticotropin-releasing hormone gene promoter." Mol. Cell. Endocrinol. 134(1): 41-50.
- Sterneck, E. und P. F. Johnson** (1998). "CCAAT/enhancer binding protein beta is a neuronal transcriptional regulator activated by nerve growth factor receptor signaling." J. Neurochem. 70(6): 2424-2433.
- Stirling, D. P., S. Liu, P. Kubes und V. W. Yong** (2009). "Depletion of Ly6G/Gr-1 leukocytes after spinal cord injury in mice alters wound healing and worsens neurological outcome." J. Neurosci. 29(3): 753-764.
- Stitt, J. T.** (1985). "Evidence for the involvement of the organum vasculosum laminae terminalis in the febrile response of rabbits and rats." J Physiol 368: 501-511.
- Straccia, M., G. Dentesano, T. Valente, M. Pulido-Salgado, C. Sola und J. Saura** (2013). "CCAAT/enhancer binding protein beta regulates prostaglandin E synthase expression and prostaglandin E2 production in activated microglial cells." Glia 61(10): 1607-1619.
- Strohmeyer, R., J. Shelton, C. Loughheed und T. Breitkopf** (2014). "CCAAT-Enhancer Binding Protein-beta Expression and Elevation in Alzheimer's Disease and Microglial Cell Cultures." PLoS One 9(1): e86617.

- Stroth, N., Y. Liu, G. Aguilera und L. E. Eiden** (2011). "Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide controls stimulus-transcription coupling in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis to mediate sustained hormone secretion during stress." J. Neuroendocrinol. 23(10): 944-955.
- Sun, W., S. H. Choi, S. K. Park, S. J. Kim, M. R. Noh, E. H. Kim, H. J. Kim und H. Kim** (2007). "Identification and characterization of novel activity-dependent transcription factors in rat cortical neurons." J. Neurochem. 100(1): 269-278.
- Sung, H. Y., S. E. Francis, D. C. Crossman und E. Kiss-Toth** (2006). "Regulation of expression and signalling modulator function of mammalian trيبbles is cell-type specific." Immunol. Lett. 104(1-2): 171-177.
- Suvannavejh, G. C., H. O. Lee, J. Padilla, M. C. Dal Canto, T. A. Barrett und S. D. Miller** (2000). "Divergent roles for p55 and p75 tumor necrosis factor receptors in the pathogenesis of MOG(35-55)-induced experimental autoimmune encephalomyelitis." Cell. Immunol. 205(1): 24-33.
- Swiergiel, A. H. und A. J. Dunn** (2002). "Distinct roles for cyclooxygenases 1 and 2 in interleukin-1-induced behavioral changes." J. Pharmacol. Exp. Ther. 302(3): 1031-1036.
- Tanaka, M. und R. M. McAllen** (2005). "A subsidiary fever center in the medullary raphe?" Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 289(6): R1592-1598.
- Tanaka, N., Y. Hoshino, J. Gold, S. Hoshino, F. Martiniuk, T. Kurata, R. Pine, D. Levy, W. N. Rom und M. Weiden** (2005). "Interleukin-10 induces inhibitory C/EBPbeta through STAT-3 and represses HIV-1 transcription in macrophages." Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 33(4): 406-411.
- Tanaka, T., S. Akira, K. Yoshida, M. Umemoto, Y. Yoneda, N. Shirafuji, H. Fujiwara, S. Suematsu, N. Yoshida und T. Kishimoto** (1995). "Targeted disruption of the NF-IL6 gene discloses its essential role in bacteria killing and tumor cytotoxicity by macrophages." Cell 80(2): 353-361.
- Taubenfeld, S. M., M. H. Milekic, B. Monti und C. M. Alberini** (2001). "The consolidation of new but not reactivated memory requires hippocampal C/EBPbeta." Nat. Neurosci. 4(8): 813-818.
- Tavares, E., F. J. Minano, R. Maldonado und M. J. Dascombe** (2006). "Endotoxin fever in granulocytopenic rats: evidence that brain cyclooxygenase-2 is more important than circulating prostaglandin E(2)." J. Leukoc. Biol. 80(6): 1375-1387.
- Tawara, K., J. T. Oxford und C. L. Jorcyk** (2011). "Clinical significance of interleukin (IL)-6 in cancer metastasis to bone: potential of anti-IL-6 therapies." Cancer Manag Res 3: 177-189.
- Tengku-Muhammad, T. S., T. R. Hughes, H. Ranki, A. Cryer und D. P. Ramji** (2000). "Differential regulation of macrophage CCAAT-enhancer binding protein isoforms by lipopolysaccharide and cytokines." Cytokine 12(9): 1430-1436.
- Tiku, K., M. L. Tikun und J. L. Skosey** (1986). "Interleukin 1 production by human polymorphonuclear neutrophils." J. Immunol. 136(10): 3677-3685.
- Tollner, B., J. Roth, B. Storr, D. Martin, K. Voigt und E. Zeisberger** (2000). "The role of tumor necrosis factor (TNF) in the febrile and metabolic responses of rats to intraperitoneal injection of a high dose of lipopolysaccharide." Pflügers Arch. 440(6): 925-932.

- Trautwein, C., C. Caelles, P. van der Geer, T. Hunter, M. Karin und M. Chojkier** (1993). "Transactivation by NF-IL6/LAP is enhanced by phosphorylation of its activation domain." Nature 364(6437): 544-547.
- Tsagarakis, S., G. Gillies, L. H. Rees, M. Besser und A. Grossman** (1989). "Interleukin-1 directly stimulates the release of corticotrophin releasing factor from rat hypothalamus." Neuroendocrinology 49(1): 98-101.
- Turnbull, A. V., S. Lee und C. Rivier** (1998). "Mechanisms of hypothalamic-pituitary-adrenal axis stimulation by immune signals in the adult rat." Ann. N. Y. Acad. Sci. 840: 434-443.
- Turnbull, A. V., S. Prehar, A. R. Kennedy, R. A. Little und S. J. Hopkins** (2003). "Interleukin-6 is an afferent signal to the hypothalamo-pituitary-adrenal axis during local inflammation in mice." Endocrinology 144(5): 1894-1906.
- Udelsman, R. und N. J. Holbrook** (1994). "Endocrine and molecular responses to surgical stress." Curr. Probl. Surg. 31(8): 653-720.
- Uematsu, S. und S. Akira** (2006). "Toll-like receptors and innate immunity." J Mol Med (Berl) 84(9): 712-725.
- Uematsu, S., M. Matsumoto, K. Takeda und S. Akira** (2002). "Lipopolysaccharide-dependent prostaglandin E(2) production is regulated by the glutathione-dependent prostaglandin E(2) synthase gene induced by the Toll-like receptor 4/MyD88/NF-IL6 pathway." J. Immunol. 168(11): 5811-5816.
- Ulich, T. R., S. M. Yin, K. Z. Guo, J. del Castillo, S. P. Eisenberg und R. C. Thompson** (1991). "The intratracheal administration of endotoxin and cytokines. III. The interleukin-1 (IL-1) receptor antagonist inhibits endotoxin- and IL-1-induced acute inflammation." Am. J. Pathol. 138(3): 521-524.
- Uskokovic, A., S. Dinic, M. Mihailovic, N. Grdovic, J. Arambasic, M. Vidakovic, D. Bogojevic, S. Ivanovic-Matic, V. Martinovic, M. Petrovic, G. Poznanovic und I. Grigorov** (2012). "STAT3/NF-kappaB interactions determine the level of haptoglobin expression in male rats exposed to dietary restriction and/or acute phase stimuli." Mol. Biol. Rep. 39(1): 167-176.
- Vallieres, L. und S. Rivest** (1997). "Regulation of the genes encoding interleukin-6, its receptor, and gp130 in the rat brain in response to the immune activator lipopolysaccharide and the proinflammatory cytokine interleukin-1beta." J. Neurochem. 69(4): 1668-1683.
- Vallieres, L. und S. Rivest** (1999). "Interleukin-6 is a needed proinflammatory cytokine in the prolonged neural activity and transcriptional activation of corticotropin-releasing factor during endotoxemia." Endocrinology 140(9): 3890-3903.
- Van Damme, J., M. R. Schaafsma, W. E. Fibbe, J. H. Falkenburg, G. Opdenakker und A. Billiau** (1989). "Simultaneous production of interleukin 6, interferon-beta and colony-stimulating activity by fibroblasts after viral and bacterial infection." Eur. J. Immunol. 19(1): 163-168.
- van der Poll, T., A. E. Barber, S. M. Coyle und S. F. Lowry** (1996). "Hypercortisolemia increases plasma interleukin-10 concentrations during human endotoxemia--a clinical research center study." J. Clin. Endocrinol. Metab. 81(10): 3604-3606.
- van Donkelaar, E. L., K. R. Vaessen, J. L. Pawluski, A. S. Sierksma, A. Blokland, R. Canete und H. W. Steinbusch** (2014). "Long-term corticosterone exposure decreases insulin sensitivity and induces depressive-like behaviour in the C57BL/6NCrl mouse." PLoS One 9(10): e106960.

- van Oss, C. J., D. R. Absolom, L. L. Moore, B. H. Park und J. R. Humbert** (1980). "Effect of temperature on the chemotaxis, phagocytic engulfment, digestion and O₂ consumption of human polymorphonuclear leukocytes." J. Reticuloendothel. Soc. 27(6): 561-565.
- Van Weemen, B. K. und A. H. Schuurs** (1971). "Immunoassay using antigen-enzyme conjugates." FEBS Lett. 15(3): 232-236.
- Verma, S., R. Nakaoke, S. Dohgu und W. A. Banks** (2006). "Release of cytokines by brain endothelial cells: A polarized response to lipopolysaccharide." Brain. Behav. Immun. 20(5): 449-455.
- von Wedel-Parlow, M., S. Schrot, J. Lemmen, L. Treeratanapiboon, J. Wegener und H. J. Galla** (2011). "Neutrophils cross the BBB primarily on transcellular pathways: an in vitro study." Brain Res. 1367: 62-76.
- Vybiral, S., M. Szekely, L. Jansky und L. Cerny** (1987). "Thermoregulation of the rabbit during the late phase of endotoxin fever." Pflugers Arch. 410(1-2): 220-222.
- Waage, A., G. Slupphaug und R. Shalaby** (1990). "Glucocorticoids inhibit the production of IL6 from monocytes, endothelial cells and fibroblasts." Eur. J. Immunol. 20(11): 2439-2443.
- Wakui, S., M. Furusato, T. Muto, H. Ohshige, H. Takahashi und S. Ushigome** (1997). "Transforming growth factor-beta and urokinase plasminogen activator presents at endothelial cell-pericyte interdigitation in human granulation tissue." Microvasc. Res. 54(3): 262-269.
- Wang, C. Y., M. W. Mayo, R. G. Korneluk, D. V. Goeddel und A. S. Baldwin, Jr.** (1998). "NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation." Science 281(5383): 1680-1683.
- Wang, L., J. Shao, P. Muhlenkamp, S. Liu, P. Klepcyk, J. Ren und J. E. Friedman** (2000). "Increased insulin receptor substrate-1 and enhanced skeletal muscle insulin sensitivity in mice lacking CCAAT/enhancer-binding protein beta." J. Biol. Chem. 275(19): 14173-14181.
- Watanabe, T., A. Morimoto, Y. Sakata und N. Murakami** (1990). "ACTH response induced by interleukin-1 is mediated by CRF secretion stimulated by hypothalamic PGE." Experientia 46(5): 481-484.
- Weinstein, M. P., M. L. Towns, S. M. Quartey, S. Mirrett, L. G. Reimer, G. Parmigiani und L. B. Reller** (1997). "The clinical significance of positive blood cultures in the 1990s: a prospective comprehensive evaluation of the microbiology, epidemiology, and outcome of bacteremia and fungemia in adults." Clin. Infect. Dis. 24(4): 584-602.
- Weiser, M. J., C. Osterlund und R. L. Spencer** (2011). "Inhibitory effects of corticosterone in the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) on stress-induced adrenocorticotrophic hormone secretion and gene expression in the PVN and anterior pituitary." J. Neuroendocrinol. 23(12): 1231-1240.
- Welsch, J., T. Hubschle, J. Murgott, C. Kirschning, C. Rummel, R. Gerstberger und J. Roth** (2012). "Fever induction by systemic stimulation with macrophage-activating lipopeptide-2 depends upon TLR2 but not CD36." Innate Immun 18(3): 541-559.
- Widner, B., A. Laich, B. Sperner-Unterweger, M. Ledochowski und D. Fuchs** (2002). "Neopterin production, tryptophan degradation, and mental depression--what is the link?" Brain. Behav. Immun. 16(5): 590-595.

- Wilhelms, D. B., M. Kirilov, E. Mirrasekhian, A. Eskilsson, U. O. Kugelberg, C. Klar, D. A. Ridder, H. R. Herschman, M. Schwaninger, A. Blomqvist und D. Engblom** (2014). "Deletion of prostaglandin E2 synthesizing enzymes in brain endothelial cells attenuates inflammatory fever." J. Neurosci. 34(35): 11684-11690.
- Williams, S. C., M. Baer, A. J. Dillner und P. F. Johnson** (1995). "CRP2 (C/EBP beta) contains a bipartite regulatory domain that controls transcriptional activation, DNA binding and cell specificity." EMBO J. 14(13): 3170-3183.
- Wirth, J. J. und F. Kierszenbaum** (1988). "Recombinant tumor necrosis factor enhances macrophage destruction of Trypanosoma cruzi in the presence of bacterial endotoxin." J. Immunol. 141(1): 286-288.
- Wong, J. M. und T. R. Billiar** (1995). "Regulation and function of inducible nitric oxide synthase during sepsis and acute inflammation." Adv. Pharmacol. 34: 155-170.
- Worm, J., J. Stenvang, A. Petri, K. S. Frederiksen, S. Obad, J. Elmen, M. Hedtjarn, E. M. Straarup, J. B. Hansen und S. Kauppinen** (2009). "Silencing of microRNA-155 in mice during acute inflammatory response leads to derepression of c/ebp Beta and down-regulation of G-CSF." Nucleic Acids Res 37(17): 5784-5792.
- Wright, S. D., R. A. Ramos, P. S. Tobias, R. J. Ulevitch und J. C. Mathison** (1990). "CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein." Science 249(4975): 1431-1433.
- Wust, S., J. Wolf, D. H. Hellhammer, I. Federenko, N. Schommer und C. Kirschbaum** (2000). "The cortisol awakening response - normal values and confounds." Noise Health 2(7): 79-88.
- Yamamoto, M., S. Uematsu, T. Okamoto, Y. Matsuura, S. Sato, H. Kumar, T. Satoh, T. Saitoh, K. Takeda, K. J. Ishii, O. Takeuchi, T. Kawai und S. Akira** (2007). "Enhanced TLR-mediated NF-IL6 dependent gene expression by Trib1 deficiency." J. Exp. Med. 204(9): 2233-2239.
- Yamasaki, K. und M. C. Lico** (1981). "Electroencephalographic serotonin synchronization: area postrema and solitary tract nucleus." Am. J. Physiol. 241(3): R158-162.
- Yan, C., M. Zhu, J. Staiger, P. F. Johnson und H. Gao** (2012). "C5a-regulated CCAAT/enhancer-binding proteins beta and delta are essential in Fcgamma receptor-mediated inflammatory cytokine and chemokine production in macrophages." J. Biol. Chem. 287(5): 3217-3230.
- Yarwood, S. J., G. Borland, W. A. Sands und T. M. Palmer** (2008). "Identification of CCAAT/enhancer-binding proteins as exchange protein activated by cAMP-activated transcription factors that mediate the induction of the SOCS-3 gene." J. Biol. Chem. 283(11): 6843-6853.
- Yssel, H., R. De Waal Malefyt, M. G. Roncarolo, J. S. Abrams, R. Lahesmaa, H. Spits und J. E. de Vries** (1992). "IL-10 is produced by subsets of human CD4+ T cell clones and peripheral blood T cells." J. Immunol. 149(7): 2378-2384.
- Zahnow, C. A.** (2009). "CCAAT/enhancer-binding protein beta: its role in breast cancer and associations with receptor tyrosine kinases." Expert Rev Mol Med 11: e12.
- Zahnow, C. A., R. D. Cardiff, R. Laucirica, D. Medina und J. M. Rosen** (2001). "A role for CCAAT/enhancer binding protein beta-liver-enriched inhibitory protein in mammary epithelial cell proliferation." Cancer Res. 61(1): 261-269.

- Zeihner, A. M., B. Fisslthaler, B. Schray-Utz und R. Busse** (1995). "Nitric oxide modulates the expression of monocyte chemoattractant protein 1 in cultured human endothelial cells." Circ. Res. 76(6): 980-986.
- Zethof, T. J., J. A. Van der Heyden, J. T. Tolboom und B. Olivier** (1994). "Stress-induced hyperthermia in mice: a methodological study." Physiol. Behav. 55(1): 109-115.
- Zhang, Y. und W. N. Rom** (1993). "Regulation of the interleukin-1 beta (IL-1 beta) gene by mycobacterial components and lipopolysaccharide is mediated by two nuclear factor-IL6 motifs." Mol. Cell. Biol. 13(6): 3831-3837.
- Zhang, Z., J. L. Bryan, E. DeLassus, L. W. Chang, W. Liao und L. J. Sandell** (2010). "CCAAT/enhancer-binding protein beta and NF-kappaB mediate high level expression of chemokine genes CCL3 and CCL4 by human chondrocytes in response to IL-1beta." J. Biol. Chem. 285(43): 33092-33103.
- Zhao, X., S. Zhuang, Y. Chen, G. R. Boss und R. B. Pilz** (2005). "Cyclic GMP-dependent protein kinase regulates CCAAT enhancer-binding protein beta functions through inhibition of glycogen synthase kinase-3." J. Biol. Chem. 280(38): 32683-32692.
- Zhou, H., G. Andonegui, C. H. Wong und P. Kubes** (2009). "Role of endothelial TLR4 for neutrophil recruitment into central nervous system microvessels in systemic inflammation." J. Immunol. 183(8): 5244-5250.
- Zhu, C. B., K. M. Lindler, A. W. Owens, L. C. Daws, R. D. Blakely und W. A. Hewlett** (2010). "Interleukin-1 receptor activation by systemic lipopolysaccharide induces behavioral despair linked to MAPK regulation of CNS serotonin transporters." Neuropsychopharmacology 35(13): 2510-2520.
- Zhu, S., K. Yoon, E. Sterneck, P. F. Johnson und R. C. Smart** (2002). "CCAAT/enhancer binding protein-beta is a mediator of keratinocyte survival and skin tumorigenesis involving oncogenic Ras signaling." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99(1): 207-212.
- Zimmermann, K., V. D. van Phi, A. Brase und L. Phi-van** (2014). "Inhibition of serotonin transporter expression by C/EBPbeta in LPS-activated macrophage cells (HD11)." Innate Immun.
- Zunszain, P. A., C. Anacker, A. Cattaneo, S. Choudhury, K. Musaelyan, A. M. Myint, S. Thuret, J. Price und C. M. Pariante** (2012). "Interleukin-1beta: a new regulator of the kynurenine pathway affecting human hippocampal neurogenesis." Neuropsychopharmacology 37(4): 939-949.

IX. Anhang

1. Publikationen

1.1 Originalarbeiten in Fachzeitschriften

- **J. Schneiders, F. Fuchs, J. Damm, C. Herden, R. Gerstberger, D. M. Soares, J. Roth, C. Rummel** (2015). „The transcription factor nuclear factor interleukin 6 mediates pro- and anti-inflammatory responses during LPS-induced systemic inflammation in mice.“ Brain. Behav. Immun. *angenommen*

1.2 Veröffentlichte Abstracts

- **J. Schneiders, F. Fuchs, J. Damm, J. Bredehöft, R. Gerstberger, D.M. Soares, J. Roth, C. Rummel** (2014). "60. Nuclear factor interleukin 6 deficient mice show alterations in the stress-axis and the serotonin metabolism." Brain. Behav. Immun. Volume 40(Supplement): e18.
- **J. Schneiders, F. Fuchs, J. Damm, R. Gerstberger, D. Soares, J. Roth, C. Rummel** (2013). "54. Nuclear factor interleukin 6 deficient mice show reduced locomotor activity and dose dependant alterations in fever and recruitment of neutrophil granulocytes to the brain during LPS-induced systemic inflammation." Brain. Behav. Immun. Volume 32(Supplement): e15–e16.

1.3 Sonstige Konferenzbeiträge

- **J. Schneiders, F. Fuchs, J. Damm, R. Gerstberger, D. Soares, J. Roth, C. Rummel** (2014). "Dual role of the transcription factor nuclear factor interleukin-6 for sickness behavior and brain inflammation." 7th Annual GGL Conference Gießen Graduate Center for the Life Sciences (GGL): Vortrag
- **J. Schneiders, F. Fuchs, J. Damm, R. Gerstberger, D. Soares, J. Roth, C. Rummel** (2014). "Nuclear factor interleukin-6 is involved in brain controlled sickness and brain inflammatory responses during LPS-induced systemic

inflammation in mice." 21. Tagung der Fachgruppe Physiologie und Biochemie der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft: Vortrag

- **J. Schneiders, F. Fuchs, J. Damm, R. Gerstberger, D. Soares, J. Roth, C. Rummel** (2013). "Alterations in the sickness response of nuclear factor interleukin 6 deficient mice." 6th Annual GGL Conference Gießen Graduate Center for the Life Sciences (GGL): Poster-Präsentation
- **J. Schneiders, F. Fuchs, J. Damm, R. Gerstberger, D. Soares, J. Roth, C. Rummel** (2012). "Role of chemokines and immune cells for communication pathways to the brain during systemic inflammation." 5th Annual GGL Conference Gießen Graduate Center for the Life Sciences (GGL): Poster-Präsentation

2. Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Veterinär-Physiologie und –Biochemie bedanken, die mich während meiner Arbeit unterstützt und mir eine unvergessliche Doktorandenzeit beschert haben.

Mein größter Dank gilt PD Dr. Christoph Rummel für seine exzellente Betreuung, sein hervorragendes Engagement, das in mich gesetzte Vertrauen und für die vielen Möglichkeiten, die er mir geboten hat. Danke für Alles!

Prof. Dr. Rüdiger Gerstberger möchte ich für die Möglichkeit danken, meine Dissertation am Institut für Veterinär-Physiologie und –Biochemie durchführen zu können sowie für die Unterstützung während dieser Zeit. Mein weiterer Dank gilt außerdem Prof. Dr. Joachim Roth, der stets hilfreiche Tipps und neue Ideen parat hatte und außerdem ein großartiger Mäuse-Chirurg ist.

Großer Dank auch an Dr. Franziska Fuchs, die die Mäuse-Zucht am Institut etabliert hat und mich mit allen Techniken und Methoden rund um die Mäuse vertraut gemacht hat. Mein weiterer Dank gilt Doreen Marks, Jolanta Murgott, Daniela Ott und Silke Engel für die tolle Unterstützung und zuverlässige Hilfe bei der Laborarbeit.

Unseren Tierpflegern Michael Haas, Jan Rodrigues-Fonseca und Ralf Matheisl möchte ich herzlich für die exzellente Betreuung der Mäuse danken. Gerd Herber, Alexander Heinrich und Norbert Wagner danke ich für die vielen Sonderanfertigungen für die Klimakammer und die schnelle und zuverlässige Hilfe bei technischen Problemen.

Des Weiteren möchte ich mich sehr herzlich bei Dr. Gerrit Eichner bedanken, der mit viel Engagement geholfen hat, die statistische Auswertung insbesondere der Temperatur-Daten zu optimieren.

Ich danke außerdem der Akademie für Tiergesundheit, die meine Teilnahme an der PNIRS-Konferenz in Stockholm finanziell unterstützt hat sowie dem GGL, das mich durch die vielfältigen Kurs-Angebote und insbesondere durch Finanzierung meiner Lab-Rotation in Montreal, Kanada unterstützt hat. In Montreal möchte ich Prof. Dr.

Giamal Luheshi danken, dass er meinen Aufenthalt in seinem Labor ermöglicht hat, sowie Ke Cui für die große Unterstützung bei meiner Arbeit dort.

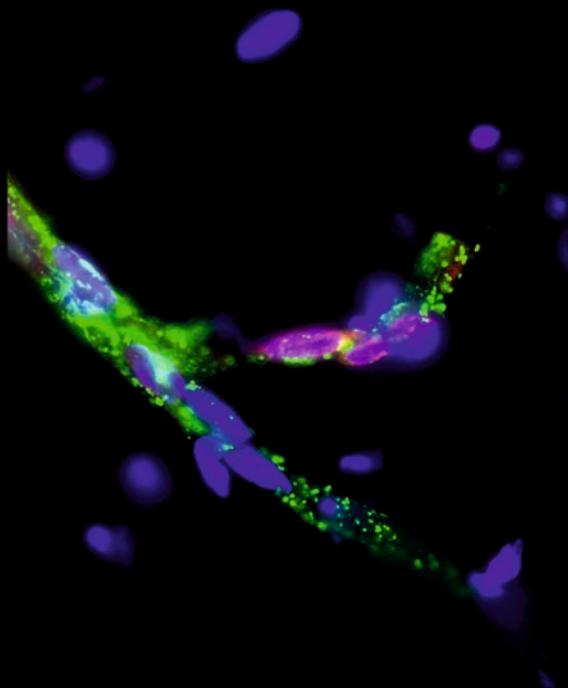
Der Firma Primerdesign danke ich für die Auszeichnung mit dem Gold Sponsorship und den damit verbundenen kostenlosen PCR-Materialien.

Mein besonderer Dank geht schließlich an meinen Freund Frank und an meine Familie für ihre Liebe und Unterstützung in allen Lebenslagen. Ohne euch wäre das Alles nicht möglich gewesen. Danke!

3. Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.

Jenny Schneiders



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFBENGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6336-8



9 17 8 3 8 3 5 19 6 3 3 6 8 1